



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Lab und Labersatzenzyme in der Käseherstellung

Technologie, Funktion und Analytik

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Claudia Handler
Matrikel-Nummer:	0204646
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Helmut Mayer

Wien, im Juni 2009

VORWORT

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Helmut Mayer, der mir die Möglichkeit gab, das Thema selbst zu wählen und für das dabei gezeigte Entgegenkommen, was bei der Realisierung meiner Diplomarbeit hilfreich und äußerst motivierend war. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihm für die Betreuung dieser Arbeit.

Weiters danke ich meinen Eltern Gabriele und Paul für die finanzielle Unterstützung während der gesamten Studiendauer und dafür, dass sie meine schulischen bzw. universitären Entscheidungen nie in Frage stellten.

Meinem Vater sei außerdem für die Korrekturarbeiten der vorliegenden Literatur gedankt.

Meinen Freunden und Kollegen möchte ich für diverse universitäre Hilfestellungen, aufbauende Worte in schwierigen Situationen und für außeruniversitäre Aktivitäten danken.

Schließlich möchte ich meinem besten Freund, Herrn DI Gerardus Hendrikus Croonen danken, der meine Begeisterung für die Naturwissenschaften erst weckte, mir bei Grundfragen vom Anfang des Studiums an half und stets zu wissenschaftlichen Diskussionen bereit war.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGEN.....	VIII
TABELLEN.....	X
ABKÜRZUNGEN	XI
1 EINLEITUNG.....	1
2 INHALTSSTOFFE IN MILCH UND KÄSE	3
2.1 Makronährstoffe	3
2.1.1 Kohlenhydrate	3
2.1.2 Fette.....	3
2.1.3 Proteine	5
2.1.3.1 Caseine	5
2.1.3.2 Molkenprotein.....	9
2.1.4 Enzyme.....	9
2.1.4.1 Plasmin.....	10
2.1.4.2 Cathepsin D.....	10
2.2 Mikronährstoffe	10
3 KÄSEREITAUGLICHKEIT DER MILCH	13
4 TECHNOLOGIE DER LABKÄSEHERSTELLUNG	15
4.1 Vorstapelung und Vorreifung.....	15
4.2 Aufbereitung der Kesselmilch.....	16
4.3 Koagulation.....	17
4.4 Bruchbearbeitung, Formen und Pressen	19
4.5 Salzen und Abtrocknen	20

4.6	Käsereifung.....	20
4.6.1	Abbau der Lactose	20
4.6.2	Lipolyse.....	21
4.6.3	Proteolyse.....	21
4.6.3.1	Fraktionierung der wasserlöslichen N-Verbindungen	23
4.6.3.2	Umkehrphasen-HPLC	25
4.6.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	25
4.6.4	Entwicklung von Aromen	26
4.6.5	Beschleunigung der Käsereifung	27
5	KÄLBERMAGENLAB	28
5.1	Herstellung.....	28
5.2	Komponenten	29
5.2.1	Chymosin	29
5.2.1.1	Spezifität in Käse	30
5.2.2	Pepsin.....	32
6	LABERSATZENZYME	33
6.1	Tierische Labersatzenzyme.....	34
6.1.1	Schweinepepsin.....	34
6.1.2	Hühnerpepsin	34
6.2	Mikrobielle Labersatzenzyme.....	34
6.2.1	Aspartatproteasen aus Pilzen	35
6.2.1.1	Herstellung.....	35
6.2.1.1.1	Eigenschaften	36
6.2.1.1.2	Spezifität der Proteolyse und Käseausbeute	36
6.2.1.1.3	Ausmaß der Casein-Hydrolyse	37
6.2.1.1.4	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Enzymaktivität.....	38
6.2.2	Aspartatproteasen aus Bakterien.....	38
6.3	Chymosin aus genmodifizierten Mikroorganismen.....	39
6.3.1	Herstellung.....	39
6.3.2	Eigenschaften	41
6.4	Pflanzliche Labersatzenzyme.....	41
6.4.1	Herstellung	42
6.4.2	Eigenschaften	42
6.4.2.1	Cynara cardunculus.....	42
6.4.2.2	Spezifität und Ausmaß der Proteolyse	43
6.4.2.3	Sensorische Analysen	45

6.4.2.4	Vergleich der Proteolyse in mit Extrakten von <i>Cynara cardunculus</i> erzeugtem Schafmilchkäse anhand zweier Studien	46
6.4.2.5	<i>Centaurea calcitrapa</i>	51
6.4.3	Neue Ansätze	52
6.4.3.1	Ultrafiltration	52
6.4.3.2	Präparatmischungen	54
7	ANALYSE DER MILCHGERINNUNGSENZYME.....	55
7.1	Analysen einer Labprobe	55
7.1.1	IDF Standard 157:2007(E).....	55
7.1.2	IDF Standard 110B:1997	55
7.1.3	IDF Standard 176:2002(E).....	57
7.1.4	Nachweis von rekombinantem Chymosin in Kälberlab-Präparaten	58
7.2	Nachweis von Lab und Labersatzenzymen in Käse.....	59
8	SCHLUSSBETRACHTUNG	61
9	ZUSAMMENFASSUNG	64
10	SUMMARY	65
11	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
12	ANHANG.....	72
	Curriculum Vitae.....	75

ABBILDUNGEN

Abbildung 1:	Vergleich der Hauptnährstoffe zwischen Kuh- und Schafmilch [WEHRMÜLLER, 2006]	3
Abbildung 2:	Aminosäuresequenzen der bovinen Caseine [BELITZ et al., 2008].....	7
Abbildung 3:	Modell einer Caseinzelle [www.iastate.edu, 2008]	8
Abbildung 4:	Mineralstoffgehalte in Schaf- bzw. Kuhmilch [RYFFEL und JAKOB, 2008]	11
Abbildung 5:	Bedarfsdeckung an verschiedenen Nährstoffen durch Hartkäse [JAKOB, 2008]	12
Abbildung 6:	Grundfließbild der Labkäseherstellung [ZICKRICK, 1996]	15
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Labgerinnung der Milch [FOX et al., 2000]	18
Abbildung 8:	Gerinnungszeit von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch [RYFFEL und JAKOB, 2008]	18
Abbildung 9:	Anstieg der SN mit dem Fortschritt der Käsereifung [McSWEENEY und FOX, 1999]	24
Abbildung 10:	Biochemische Reaktionswege zur Aromenbildung [MARILLEY und CASEY, 2004]	26
Abbildung 11:	Aminosäuresequenz des bovinen Präprochymosin, des Prochymosin A und des Chymosin A [TEUBER, 1997]	29
Abbildung 12:	Fließbildschema zur Herstellung von CHY-MAX [KAMMERLEHNER, 1999]	40
Abbildung 13:	<i>Cynara cardunculus</i> [www.soc-botanical- artists.org].....	43
Abbildung 14:	Urea-PAGE-Elektrophoretogramm der Fraktion WISN und WSN für Schafmilchkäse, hergestellt mit einem Extrakt aus <i>C.</i> <i>cardunculus</i> und aus Kälbermagenlab [SOUSA und MALCATA, 1997]	44

Abbildung 15:	Veränderung von WSN/TN, PTA-SN/TN und TCA-SN/TN in Schafkäseproben mit Extrakten aus <i>C. cardunculus</i> und Kälbermagenlab [SOUSA und MALCATA, 1997]	47
Abbildung 16:	Veränderung von WSN/TN, PTA-SN/TN und TCA-SN/TN in Schafkäseproben hergestellt mit Proteinase aus <i>C. cardunculus</i> , Kälbermagenlab und Microlant [CHEN et al., 2003]	48
Abbildung 17:	Veränderung des WSN-Gehalts	59
Abbildung 18:	Veränderung des TCA-SN-Gehalts	50
Abbildung 19:	Veränderung des PTA-SN-Gehalts	50
Abbildung 20:	Analyse einer unbekannten Labprobe [IDF, 1996]	56
Abbildung 21:	Doppelte Immunodiffusion für Kälbermagenlab und Kälbermagenlab mit 1 % des Enzyms von <i>Rhizomucor miehei</i> [IDF, 1996]	57

TABELLEN

Tabelle 1: Inhalt der WSN, TCASN und PTASN-Fraktion [ARDÖ, 1999]	25
Tabelle 2: Relative Geschwindigkeit der Hydrolyse von Peptiden aus der κ - Casein-Aminosäuresequenz durch Lab [BELITZ et al., 2008]	32
Tabelle 3: Kommerzielle mikrobielle Labaustauschstoffe [STERNBERG, 1976]..	36
Tabelle 4: Sensorische Bewertung von Pecorino Käse durch geschulte Sensoriker auf einer Skala von 0 bis 10 [CHEN et al., 2003]	46

ABKÜRZUNGEN

ACP-ELISA	Antigen Coated Plate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CCP	kolloidales Calciumphosphat
Da	Dalton
GC	Gaschromatographie
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IMCU	International Milk-Clotting Units
MS	Massenspektrometrie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ppb	Teile pro Milliarde
REMCAT	Relative Milk-Clotting Activity Test
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TCASN	trichloressigsäure-lösliche Stickstofffraktion
TN	Gesamtgehalt der Stickstofffraktion
WSN	wasserlösliche Stickstofffraktion

1 EINLEITUNG

Die Käseerzeugung lässt sich etwa 6.000 Jahre zurückverfolgen und gilt somit als eines der ältesten biotechnologischen Verfahren [FOX und McSWEENEY, 1997].

Prinzipiell wird zwischen zwei Arten der Käseherstellung unterschieden. So verursacht eine Senkung des pH-Wertes mithilfe von Milchsäurebakterien die Milchkoagulation, wie dies bei der Erzeugung von Frischkäse der Fall ist, oder aber die Koagulation wird mithilfe eines Labferments eingeleitet. Letztere Methode machte sich der Mensch zunutze, nachdem er die vom Kalb kurzfristig gesäugte und im Abomasum, dem vierten Magen, geronnene Milch im Schlachtkörper vorfand. Kälbermägen wurden wahrscheinlich als Aufbewahrungsmittel für die Milch genutzt. Erschütterungen während des Transportes ließen zunächst die gebildete Gallerte brechen und die Molke austreten. Der zusammengewachsene Bruch eignete sich im Gegensatz zum Rohprodukt besser zur Bevorratung.

Aus historischen Überlieferungen geht hervor, dass Kälbermagenlab von den Ägyptern vor etwa 4.000 Jahren bewusst hergestellt wurde. In der Zeit des Römischen Reiches, zwischen 500 vor und 500 nach Christus war die Technologie von Labkäse soweit etabliert, dass er schon bald als fixer Bestandteil der Nahrung römischer Bürger und v.a. von Soldaten und Ringkämpfern galt. Vermutlich führten schließlich die Massenwanderungen nach dem Fall des römischen Reiches zur Verbreitung des Käsekonsums. Die Herstellungsverfahren haben sich bis zum 19. Jahrhundert kaum geändert [FOX, 1993].

Im Jahre 2006 lag die Käseproduktion in Österreich bei 142.000 Tonnen [EC, 2007]. Hierfür wären etwa 500.000 Kälbermägen notwendig. Tatsächlich wurden jedoch nur 87.000 Kälber geschlachtet [EC, 2007], der Bedarf an natürlichem Labextrakt konnte demnach nur zu etwa 18 % gedeckt werden.

Weltweit betrachtet wären ebenfalls rund 80 % mehr Kälberschlachtungen notwendig, um die ständig steigende Käseproduktion zu ermöglichen [KAMMERLEHNER, 1999].

Diese Tatsachen wirkten sich in einer Preiserhöhung von natürlichem Labextrakt aus und waren in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts Ursache für die Suche nach Labersätzen mit vergleichbarer Wirkung.

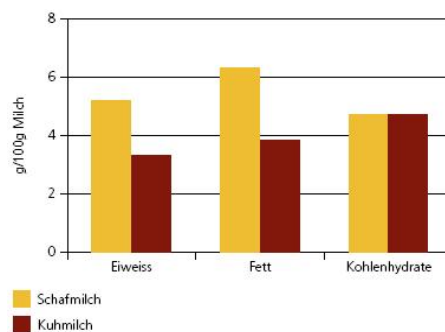
Diese Arbeit bezieht sich sowohl auf Labersätze, welche aus Tieren, Pilzen und Pflanzen gewonnen als auch jene, die mithilfe gentechnologischer Methoden hergestellt werden.

Im Folgenden sollen daher zunächst die Technologie der Käseherstellung und die Eigenschaften des Kälbermagenlafs beschrieben werden, um die Vor- und Nachteile alternativer Milchkoagulanten darstellen zu können.

2 INHALTSSTOFFE IN MILCH UND KÄSE

Milch ist eine Emulsion von Fett in wässriger Lösung (O/W) mit einem pH-Wert von 6,5 – 6,75. Ihre Zusammensetzung ist von der Herkunft stark abhängig. So weist Kuhmilch etwa weniger Protein und Fett auf. Aufgründdessen ist in Schafmilch der Gehalt an fettlöslichen Vitaminen generell höher. Die Fettsäurerelationen in Kuh- und Schafmilch unterscheiden sich maßgeblich.

Abbildung 1: Vergleich der Hauptnährstoffe zwischen Kuh- und Schafmilch [WEHRMÜLLER, 2006]



2.1 Makronährstoffe

2.1.1 Kohlenhydrate

Milch enthält etwa 4,8 % Kohlenhydrate, davon macht Lactose ca. 99 % aus. Diese ist aus β -D-Galactose und α/β -D-Glucose aufgebaut, welche β -1,4-glycosidisch gebunden sind [BELITZ et al., 2008]. Während der Käsereifung wird sie rasch zu Milchsäure abgebaut und kommt in Hartkäsen schließlich nur mehr in sehr geringen Konzentrationen vor [JAKOB et al., 2008]. Freie Glucose und Galactose, als Vorstufen der Lactose-Synthese, kommen, wie auch Aminos Zucker und Oligosaccharide nur in Spuren vor [BELITZ et al., 2008].

2.1.2 Fette

Kuhmilch enthält etwa 3,9 % Fett, Schafmilch im Vergleich dazu 7,2 %. Im Käse variiert der Gehalt je nach Fettgehalts- und Festigkeitsstufe. Er liegt für Hartkäse bei ca.

30 g, für Weichkäse bei 20 – 25 g. Die Fettkügelchen der Kuhmilch mit einem Durchmesser von etwa 1 – 5 μm sind von einer durchschnittlich 8 – 9 nm dicken Membran aus Phospholipiden und ca. 40 verschiedenen Proteinen, den „milk fat globule membrane proteins“ bestehend, umgeben. Vor allem dominieren hier sechs Glykoproteine. Beispiele hierfür sind Xanthin-Oxidoreduktase, Acetylcholinesterase und eine saure wie auch eine alkalische Phosphatase [BELITZ et al., 2008]. Die Fettkügelchen in der Schafmilch sind wesentlich kleiner und können daher aufgrund der vergrößerten Gesamtoberfläche schneller von Enzymen angegriffen werden. Zudem ist der höhere Gehalt an kurz- und mittelkettige Fettsäuren ausschlaggebend für die bessere Verdaulichkeit von Schafmilch [WEHRMÜLLER et al., 2007].

Beim Homogenisieren wird die Milch durch eine Düse gepresst. Je nach dabei angewendetem Druck sinkt der Durchmesser der Fettkügelchen; bei Kuhmilch auf unter 1 μm . Die Membran wird bei diesem Vorgang zerstört. Es erfolgt eine Neubildung, in der nun auch Caseine und damit die sehr aktive Lipoprotein-Lipase, ebenfalls ein Glykoprotein, Bestandteile sind.

Durch Pasteurisation der Milch erfolgt eine Inaktivierung der Lipase. Wird dieser Prozess übersprungen, setzt daher die Lipolyse ein. Als Folge kommt es zur Entwicklung des für die Milch typischen Fehlaromas.

Das Milchfett wird während der Käsereifung grundsätzlich kaum verändert. Triglyceride sind mit 95 - 96 % die Hauptkomponente des Milchfettes. Die am häufigsten vorkommende Fettsäure ist Ölsäure (cis-9-Octadecensäure) mit etwa 25,5 % in Kuhmilch. Insgesamt überwiegen hier jedoch die gesättigten, geradkettigen Fettsäuren, darunter vor allem Palmitinsäure (C16) mit 23,8 %. Der Anteil kurzkettiger Fettsäuren ist mit 9 % im Vergleich zu anderen Fetten hoch. In kleinen Mengen kommen auch ungeradzahlige und verzweigtkettige Fettsäuren vor [BELITZ et al., 2008]. Im Schafmilchfett überwiegt Palmitinsäure, insgesamt dominieren aber langkettige Fettsäuren [MAURER et al., 2006].

Insgesamt ergibt sich in Kuhmilch somit ein Verhältnis zwischen gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 57-63 : 21-25 : 3,8–5,4 in Abhängigkeit vom Futter. Das Verhältnis von ω -6-Fettsäuren zu ω -3-Fettsäuren beträgt 2:1 [JAKOB et al., 2008]. In Schafmilch ist das Verhältnis zwischen mehrfach, einfach ungesättigten und gesättigten Fettsäuren ähnlich. Das ω -6-Fettsäuren zu ω -3-Fettsäuren-Verhältnis liegt bei ca. 1,6:1 [MAURER et al., 2006].

Eine hohe Aufnahme von gesättigten Fettsäuren mit der Nahrung wird oft für das Entstehen von Herz-Kreislauferkrankungen verantwortlich gemacht. Studien zeigen jedoch, dass die Fettsäuren hierbei unabhängig voneinander betrachtet werden müssen. Danach vermag die kurzkettige Myristinsäure etwa das LDL-Cholesterin im Blut zu senken.

Ebenso sind Transfettsäuren (TFS), die im Käsefett zu 3 – 6 % vorkommen, mit Herz-Kreislaufkrankheiten assoziiert. Es ist aufgrund zahlreicher klinischer Studien jedoch davon auszugehen, dass die geringen Mengen natürlich vorkommender Transfettsäuren zu keiner Veränderung der Blutfettwerte führen. Auch Isomere der konjugierten Linolsäure (CLA) kommen vor, welcher zum Teil potentiell positive Wirkungen zugeschrieben werden [JAKOB et al., 2008].

2.1.3 Proteine

Proteine haben ihre Funktion im Aufbau und der Erneuerung von Körpergewebe. Kuhmilch besteht zu etwa 3,3 %, Schafmilch zu etwa 5,6 % aus Protein. Käse enthält pro 100 g mit wenigen Ausnahmen 20 – 30 g [JAKOB et al., 2008]. Das Milchprotein lässt sich in Casein (ca. 80 %) und Molkenprotein (ca. 20 %) einteilen.

2.1.3.1 Caseine

Caseine sind eine Gruppe von phosphorhaltigen Proteinen, die bei 20 °C und einem pH-Wert von 4,6 eine unlösliche Fraktion darstellen. Da ein linearer Zusammenhang zwischen Käseausbeute und dem Caseingehalt der Milch besteht, ist es aus wirtschaftlichen Gründen von großem Interesse, die genaue Zusammensetzung der Fabrikationsmilch einschließlich dem Caseingehalt zu kennen. Milchlabors sind

zunehmend mit speziellen Analysegeräten zur raschen quantitativen Casein-Bestimmung ausgestattet. Die Caseinkonzentration in der Milch wird durch Faktoren wie Genetik, Eutergesundheit, Laktationsstadium und die Fütterung der Kuh beeinflusst [GOY et al., 2005].

Durch alkalische Elektrophorese lässt sich die Caseinfraktion in die Einzelkomponenten α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ - und γ -Casein trennen, von denen wiederum unterschiedliche genetische Varianten bekannt sind. Ihr Vorkommen ist laut Studien an schweizerischen Rindern rassenspezifisch. So überwiegt zum Beispiel beim α_{s1} -Casein die B-Variante bei allen untersuchten Tieren, die C-Variante kommt allerdings nur bei einzelnen Rassen in nennenswerten Frequenzen vor. Über längere Zeiträume betrachtet, können jedoch auch innerhalb einer Rasse Veränderungen beobachtet werden [JAKOB, 1994].

Schafmilch enthält um ca. 42 % mehr Casein. Beim Einsatz gleicher Mengen Milch kann aus Kuhmilch daher weniger Käsemasse erzielt werden [PULINA und BENCINI, 2004].

α_{s1} -Caseine machen mit 34 % den Hauptanteil der Caseinkomponenten in der Magermilch aus. Die B-Variante besteht aus einer Peptidkette, die 199 Aminosäuren umfasst. Sie enthält pro mol acht Phosphoserinreste. Die Region um die phosphorylierten Serinreste ist extrem polar. α_{s1} -Caseine können Calcium-Ionen binden. Bei den in der Milch vorkommenden Calcium-Konzentrationen sind sie daher fällbar.

Die A-Variante des α_{s2} -Caseins besteht aus einer Peptidkette mit 207 Aminosäuren, welche 11 Phosphoserinreste enthält und leichter als α_{s1} -Caseine fällbar ist.

β -Caseine sind zu rund 25 % im Gesamtprotein der Milch vertreten. Die Variante A2 besteht aus 209 Aminosäureresten, wovon fünf Serinreste phosphoryliert sind. β -Casein ist ebenfalls durch das Ca^{2+} der Milch fällbar. Aufgrund der Molekülstruktur mit polarem Kopf und apolarem Schwanz ist β -Casein hydrophob, stärker als die anderen Caseinkomponenten.

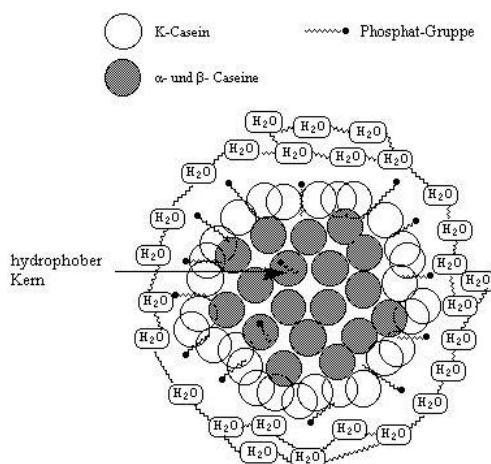
d)

Z ^d	E	Q	N	Q	E	Q	P	I	R	C	E	K	D	E	R	F	F	S	D
K	I	A	K	Y	I	P	I	Q	Y	V	L	S	R	Y	P	S	Y	G	L
N	Y	Y	Q	Q	K	P	V	A	L	I	N	N	Q	F	L	P	Y	P	Y
Y	A	K	P	A	A	V	R	S	P	A	Q	I	L	Q	W	Q	V	L	S
D	T	V	P	A	K	S	C	Q	P	A	P	T	T	M	A	R	H	P	S
P	H	L	S	F	M	A	I	P	P	K	K	N	Q	D	K	T	E	I	H
T	I	N	T	I	A	S	G	E	P	T ^b	S	T ^b	P	T ^b	I	E	A	V	P
S	T	V	A	T	L	E	A	S ^a	P	E	V	I	E	S	P	P	E	I	E
T	V	Q	V	T	S	T	A	V											

γ -Caseine entstehen beim enzymatischen Abbau der β -Caseine durch die milcheigene Proteinase Plasmin.

Mehr als 95 % des Caseins liegt in Form von Mizellen vor. Diese sind durchschnittlich aus 5.000 Submizellen mit einem Gesamtdurchmesser von 10 - 300 nm aufgebaut, wobei zwischen zwei Typen unterschieden werden kann. Während sich die hydrophoben α_{s1} -, α_{s2} - und β - Caseine im Kern der Mizelle befinden, lagern sich die hydrophilen κ -Caseine vorwiegend an der Oberfläche an und halten die Mizelle somit in Lösung. κ -Caseine treten jedoch vereinzelt auch im Inneren auf. Die Untereinheiten sind über Calciumphosphatbrücken verbunden [BELITZ et al. 2008]. Die Caseinmizellen in Schafmilch sind etwas kleiner, was zur Annahme führt, dass Schafmilchprotein aufgrund der vergrößerten Mizelloberfläche schneller enzymatisch gespalten werden kann und daher leichter verdaulich ist [RYFFEL et al., 2008].

Abbildung 3: Schematisches Modell einer Caseinmizelle [www.iastate.edu, 2008]



Eine Mizelle besteht somit zu etwa 94 % aus Protein, die restlichen 6 % stellen niedermolekulare Verbindungen dar. Neben Calcium- und Phosphatverbindungen kommen Mg-Ionen und Citrat vor, gemeinsam wird dieser Komplex als kolloidales Calciumphosphat (CCP) bezeichnet. [BELITZ et al., 2008]

2.1.3.2 Molkenprotein

Die Hauptkomponenten des Molkenproteins der Kuhmilch sind β -Laktoglobulin (ca. 55 %) und α -Laktalbumin (ca. 20 %), weiters kommen Immunglobuline (ca. 15 %), Blutserumalbumin (ca. 7 %) und Laktoferrin (ca. 2 %) vor. Sie bleiben bei 20 °C und einem pH-Wert von 4,5 gelöst und können mit TCA (Trichloressigsäure) gefällt werden. Bei der Käseerzeugung fallen sie als Nebenprodukt an. Eine Rückführung in die Käsemasse ist aus wirtschaftlichen Gründen wünschenswert und wird mithilfe der Ultrafiltration mehr oder weniger erfolgreich realisiert. Eine weitere Methode bezieht sich auf die Reaktionsfähigkeit der Molkenproteine mit der Caseinfraktion, welche durch Hitzedenaturierung gesteigert werden kann. Diese Technologie wird jedoch kommerziell nicht angewendet [McSWEENEY und FOX, 1997].

Zum Molkenprotein zählen weiters niedermolekulare N-Substanzen, die aus Stoffwechselreaktionen der Milchinhaltsstoffe stammen und weder bei hohen Temperaturen noch durch TCA fällbar sind. Es sind dies unter anderem Harnstoff, Kreatin, Harnsäure, Orotsäure, Hippursäure und Ammoniak. Gemeinsam machen sie weniger als 0,1 % der N-Fraktion des Molkenproteins aus.

Die Molkenproteine der Schafmilch sind hitzelabiler und werden bei Pasteurisierungstemperaturen teilweise denaturiert, was im Verlauf der Käseproduktion qualitätsmindernde Folgen haben kann [JAKOB et al., 2008].

2.1.4 Enzyme

Milcheigene Enzyme als Minorkomponenten werden durch thermische Behandlung der Milch zum Teil inaktiviert, um Reaktionen mit Fetten und Proteinen zu verhindern, welche Qualitätsverluste verursachen könnten.

Etwa 50 Milchenzyme sind bekannt. Sie stammen von den Organen, vom Blut und teilweise von Milchdrüsenzellen und sind entweder an Casein oder an die Membran der Fettkügelchen gebunden. Im Folgenden sollen einige für die Käserei relevante Enzyme beschrieben werden.

2.1.4.1 Plasmin

Plasmin, eine Proteinase, die hauptsächlich mit den Caseinmizellen assoziiert ist, besitzt auch nach einer Erhitzung bei 70 °C für 10 Minuten noch 20 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Das Enzym ist außerdem selbst nach Sterilisationsverfahren teilweise aktiv. Die Konzentration des Plasmins in der Milch korreliert mit dem Fortschritt der Laktation und ist am Ende einer Periode mehr als doppelt so hoch [RENNER, 1989].

2.1.4.2 Cathepsin D

Cathepsin D zählt, wie auch Pepsin und Chymosin zu den Asparaginsäure-Endopeptidasen und hat ein Optimum bei einem pH-Wert von 3 – 5. Es wird als inaktives Procathepsin (Zymogen) synthetisiert und durch Autokatalyse zum Pseudocathepsin D. Die Bildung von aktivem Cathepsin erfolgt schließlich durch das Einwirken anderer Proteasen. In der Milch ist die Konzentration des Procathepsin D am höchsten. Die aktive Form hydrolysiert wie auch Plasmin sowohl α_{s1} - und α_{s2} -Caseine als auch β -Casein. Cathepsin D spielt während der Käsereifung bei geringer Labaktivität wahrscheinlich eine bedeutende Rolle [HURLEY et al., 1999].

2.2 Mikronährstoffe

Der Vitamingehalt der Milch ist von der Fütterung der Tiere und dem Fettanteil abhängig. So weist die Milch von auf Weiden grasenden Kühen einen höheren Vitamingehalt verglichen mit der Milch von Kühen aus Stallhaltung auf. Fettreiche Milch enthält mehr Retinol und Calciferol als teilentrahmte Milch. Sie ist weiters eine gute Quelle für die Bedarfsdeckung an Riboflavin [RYFFEL und JAKOB, 2008]. Die Retinol-, Tocopherol-, Thiamin- und Riboflavin-Gehalte sind laut einer schweizerischen Studie in Schafmilch höher als in Kuhmilch [MAURER et al., 2006].

Während der Kuhmilchkäseherstellung werden folgende Vitamine zum Teil angereichert: Retinol wird um den Faktor 5,4 erhöht, Tocopherol um 4,8, Riboflavin um 3,4, Thiamin um 1,7. Der Gehalt an Cobalamin variiert stark, da es von Milchsäurebakterien ebenso verstoffwechselt wie auch produziert wird.

Unter den Mineralstoffen in der Milch sind besonders Calcium, Phosphor und Zink zu nennen. Vor allem ersteres kommt hier in relativ großen Mengen vor. Demnach liefert auch Käse einen wichtigen Beitrag zur Bedarfsdeckung dieser Nährstoffe. 100 mg Hartkäse aus Kuhmilch enthält etwa bis zu 1.000 mg Calcium, 130 – 660 mg Phosphor und 3,7 – 4,6 mg Zink. Abbildung 5 zeigt die Deckung des Tagesbedarfs an verschiedenen Nährstoffen durch Hartkäse.

Dieselbe Menge Schafmilch enthält insgesamt mehr Mineralstoffe als Kuhmilch. In der Trockenmasse werden jedoch ähnliche Konzentrationen gemessen. Abbildung 4 zeigt einen Vergleich der mengenmäßig bedeutenden Mineralstoffe in der Milch [RYFFEL und JAKOB, 2008].

Abbildung 4: Mineralstoffgehalte in mg pro 100 g Schaf- bzw. Kuhmilch [RYFFEL und JAKOB, 2008]

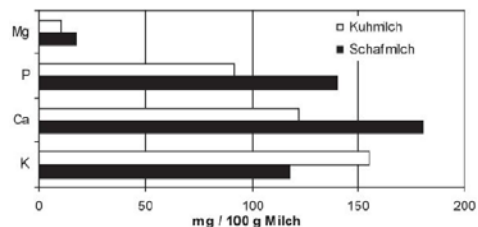
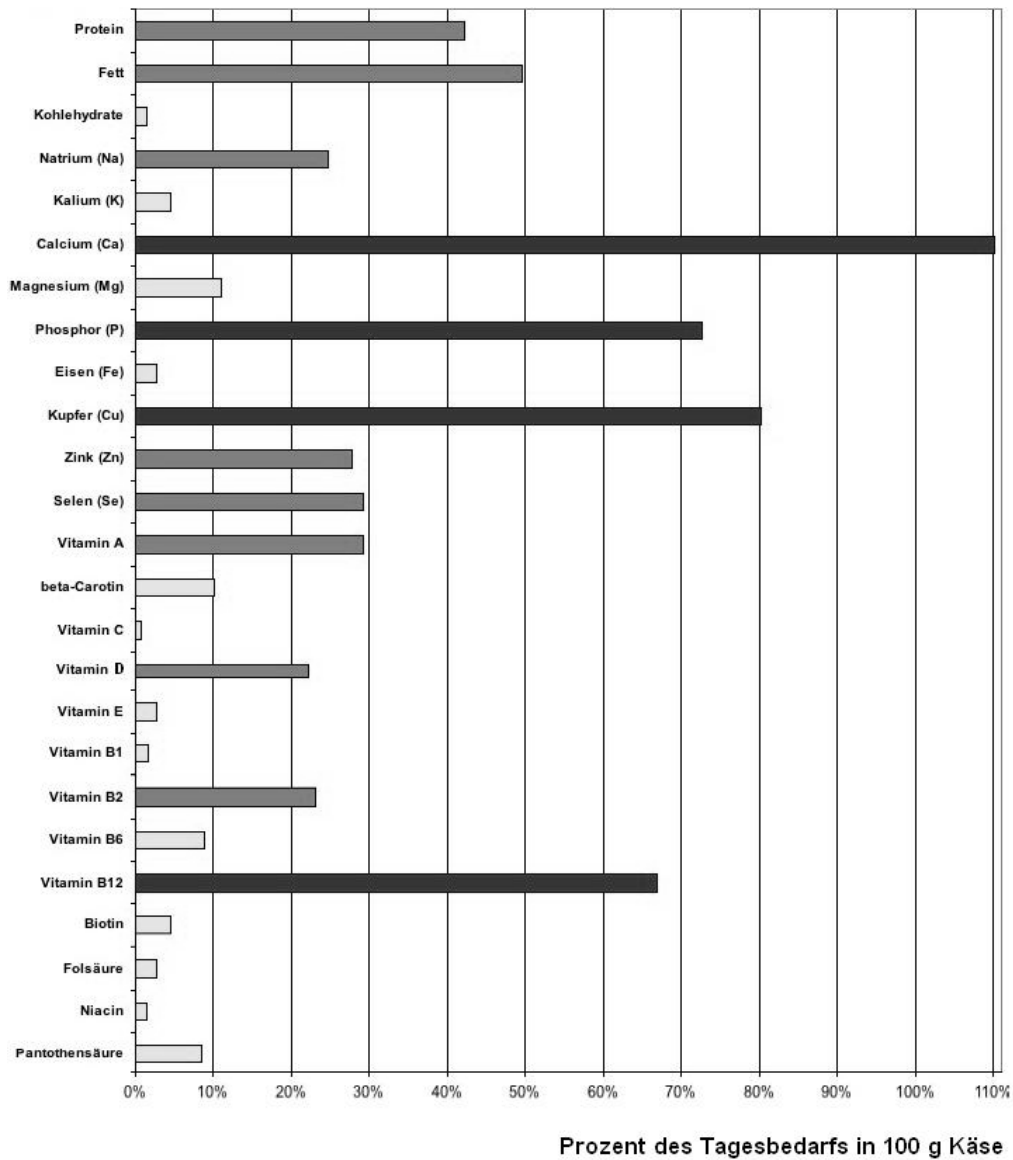


Abbildung 5: Bedarfsdeckung an verschiedenen Nährstoffen durch Hartkäse gemessen am Tagesbedarf für Männer (DACH-Referenzwert für Männer mit 80 kg Körpergewicht) [JAKOB et al., 2008]



3 KÄSEREITAUGLICHKEIT DER MILCH

Die Keimzahl der Milch gesunder Kühe liegt beim Verlassen des Euters bei ca. 100 – 1.000 Keimen pro ml. Die Keime stammen einerseits durch Kontamination aus dem Strichkanal, andererseits aus der Luft, hauptsächlich jedoch vom Melkgeschirr und von der Euterhaut [GRAVERT, 1983].

Nach der Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 darf Rohmilch zur Herstellung von Labkäse bei der Anlieferung an den Bearbeitungsbetrieb bei 30 °C eine maximale Keimzahl von 100.000/ml aufweisen. Bei Überschreiten dieses Wertes lassen sich bereits sensorische Veränderungen feststellen. Bakterielle Proteasen, weitgehend hitzeresistent, bauen das Milcheiweiß ab und aktivieren das Plasminogen der Milch zu Plasmin, welches zu weiteren Abbaureaktionen führt. Ein Verlust an Eiweiß bis etwa 10 % kann die Folge sein [ZICKRICK, 1996]. Außerdem werden mögliche Kontaminanten während der Käseherstellung im Bruch konzentriert und können so die Gesundheit des Konsumenten beeinträchtigen [FOX et al., 2000].

Die Hygienevorschriften in der Milchproduktion anderer Tierarten als Milchkühen sind in der EU weniger streng. So wurden für diese im Jahre 2008 in der EG-Verordnung der Grenzwert mit 500.000 Keimen pro ml Milch festgelegt.

Häufig sind Kontaminationen mit Staphylokokken. Typisch für Staphylokokken-Infektionen sind chronische und herdförmige Eiterungen. Etwa 10 % bilden ein Enterotoxin, welches weitgehend thermostabil ist. Bei sachgemäßer Kühlung der Rohmilch wird die Vermehrung der Keime durch die konkurrierende Mikroflora jedoch gehemmt, sodass kaum für den Menschen bedrohliche Mengen an Enterotoxinen produziert werden können [GRAVERT, 1983].

Käsereimilch muss frei von qualitätsmindernden Hemmstoffen sein, denn diese unterdrücken Käsereikulturorganismen in ihrer Entwicklung. Dazu zählen hauptsächlich Arzneimittel, die zur Euterbehandlung von Milchkühen eingesetzt werden [ZICKRICK,

1996]. Problematisch ist die relativ hohe Resistenz der Antibiotika gegenüber Pasteurisationstemperaturen [ALBRIGHT, 1961].

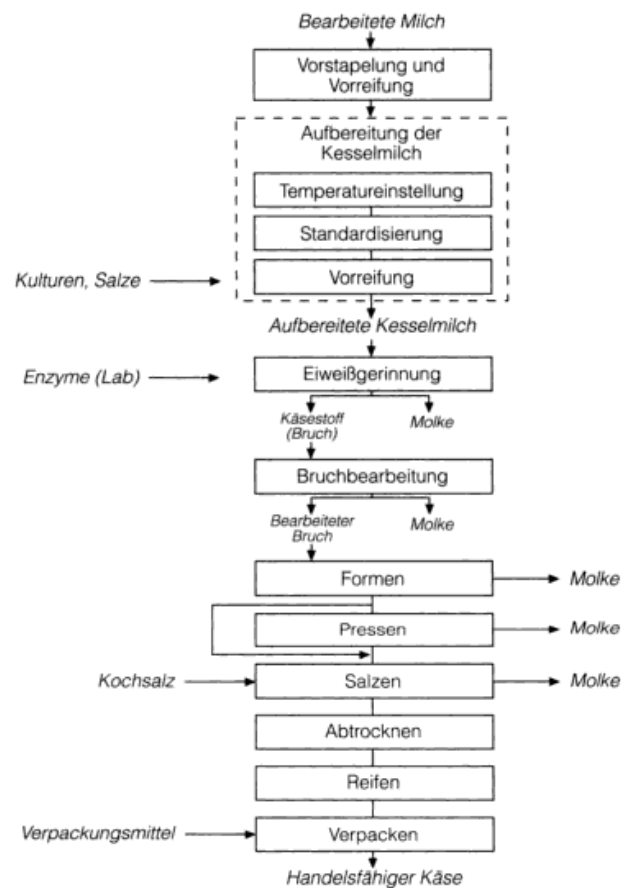
Weiters beeinflussen Pflanzenschutzmittel, Desinfektionsmittel und Rückstände aus Futtermitteln die Käseproduktion negativ [ZICKRICK, 1996].

Für die industrielle Käseherstellung wird daher in der Regel pasteurisierte Milch herangezogen. Die dadurch inaktivierten, für die Käseherstellung nützlichen Mikroben müssen daher der Käsereimilch folglich wieder zugeführt werden. In einigen kleinen Käsereien wird dennoch Rohmilch aufgrund der Aromenvielfalt im Endprodukt verarbeitet. Nach der EU-Verordnung 853/2004 müssen jedoch alle Rohmilchprodukte seit 2006 als solche gekennzeichnet werden [ALBRECHT-SEIDEL und MERTZ, 2006].

4 TECHNOLOGIE DER LABKÄSEHERSTELLUNG

Die Herstellung von Labkäse erfordert ein qualitativ hochwertiges Ausgangsprodukt. Mikrobiologisch einwandfreie Rohmilch ist nicht nur für eine angemessene Käseausbeute, sondern auch um spätere Käsefehler zu vermeiden, von großer Bedeutung.

Abbildung 6: Grundfließbild der Labkäseherstellung [ZICKRICK, 1996]



4.1 Vorstapelung und Vorreifung

Die Vorstapelung und Vorreifung dient der Anreicherung von Milchsäurebakterien in der Rohmilch. Hierfür wird die Rohmilch gegebenenfalls mit 0,01 bis 0,3 % einer

Bakterienkultur beimpft. Die angewendete Menge ist abhängig von der Mikroflora der Rohmilch zu Beginn der Vorreifung und von der angestrebten Käsesorte. Die Vorreifung erfolgt für Hartkäse bei 8 bis 10 °C und für Weichkäse bei 8 bis 12 °C, bis ein gewisser Säuregrad, bestimmt durch die Soxhlet-Henkel-Zahl (SH-Zahl), erreicht ist. Diese lässt sich durch Titration von 100 ml der Milch mit 0,25 M Natronlauge gegen den Indikator Phenolphthalein bestimmen [ZICKRICK, 1996].

$$SH = V_{(\text{NaOH})} \frac{100}{25}$$

Säuerungskulturen

Säuerungskulturen haben neben der pH-Wert-Senkung durch den Abbau der Laktose zu Milchsäure teilweise auch die Funktion der Aromenbildung. Einerseits geschieht dies durch Nebenreaktionen der Milchsäuregärung, andererseits durch den Abbau von Proteinen und in geringem Maße von Lipiden während der Reifung.

Starterkulturen lassen sich je nach Temperaturoptimum in mesophile (20 – 39 °C) und thermophile (30 – 45 °C) Kulturen einteilen. Während für die Herstellung von Schnitt-, Weich- und Frischkäse hauptsächlich mesophile Kulturen herangezogen werden, sind für die Hartkäseherstellung eher thermophile Kulturen geeignet.

In der Praxis wird meist eine Mischkultur aus etwa zwei bis vier Bakterienarten angewendet. Jede Käsesorte erfordert ein spezielles Gemisch, um die charakteristischen Eigenschaften zu entwickeln. Als Beispiel für die Erzeugung von Emmentaler wären die hierfür typisch thermophilen Kulturen zu nennen, wie etwa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *helveticus*, eventuell ergänzt mit *Lactococcus lactis* [ALBRECHT-SEIDEL und MERTZ, 2006].

4.2 Aufbereitung der Kesselmilch

Die vorgereifte Milch wird nach der Temperatureinstellung in der industriellen Käseproduktion standardisiert. Hierbei erfolgt zunächst die Einstellung des Fettgehalts

in Abhängigkeit vom angestrebten Fettanteil des Endproduktes. Weiters ist bei Bedarf eine Anreicherung der Milch mit Eiweiß möglich, um die Ausbeute zu erhöhen.

Vor dem Zusatz der Käseerhilfsstoffe kann die Käseeremilch zur Reduktion der Gesamtkeimzahl pasteurisiert oder um die Milchflora zu schwächen, thermisiert werden. Wenn notwendig, kann weiters ein Sporenreduktionsverfahren induziert werden, um Spätblähungen in Hart- und Schnittkäsen zu vermeiden. War hierfür lange Zeit der Zusatz von Nitraten üblich, um das Auskeimen der Sporen zu verhindern, werden heutzutage aufgrund der möglichen Bildung von karzinogenen Nitrosaminen durch Reaktion von Nitriten mit sekundären Aminen immer häufiger spezielle Entkeimungszentrifugen eingesetzt [ZICKRICK, 1996].

Sobald die Kesselmilch ein pH-Optimum für das eingesetzte Gerinnungsenzym aufweist und eine bestimmte Temperatur erreicht ist, wird die Kesselmilch eingelabt.

4.3 Koagulation

Die Koagulation ist primäre Folge des Einlabens der Milch und lässt sich in eine enzymatische und in eine sichtbare Gelbildungsphase einteilen. Der Einsatz des Labs spielt in der Erzeugung von gereiften Käsen eine größere Rolle als bei der Frischkäseherstellung. Es ist in Form von Extrakten, Pasten, Pulver und Tabletten auf dem Markt und wird in gelöster Form in die Milch eingerührt.

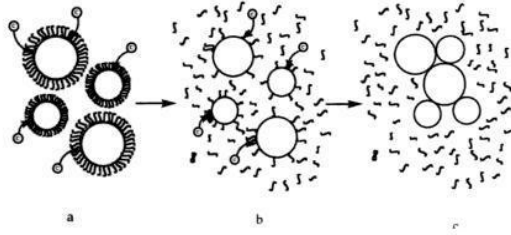
Während der Käseerzeugung gehen etwa 80 % des eingesetzten Labs in die Molke über. Die geringen Konzentrationen im Endprodukt sind meist schwer und nur mithilfe aufwendiger Verfahren nachweisbar [SINGH und CREAMER, 1990].

In der primären Phase der Koagulation wird vorwiegend das κ -Casein hydrolysiert. Die Folge ist eine Instabilität der Caseinmizelle.

Die sekundäre Phase ist durch die sichtbare Denaturierung der Milch gekennzeichnet, in der die Caseine unter Anwesenheit von Calcium erneut zum Gel aggregieren. Die

Mizellen bilden nun über Calciumbrücken ein Gerüst, in welches zunächst Molkenproteine und Fettkügelchen eingeschlossen werden. Eine Zunahme an gebildeten Calciumbrücken hat eine stärkere Kontraktion zur Folge, welche ein Austreten der Molke, die Syneräse, ermöglicht [BELITZ et al., 2008].

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Labgerinnung der Milch [FOX et al., 2000]

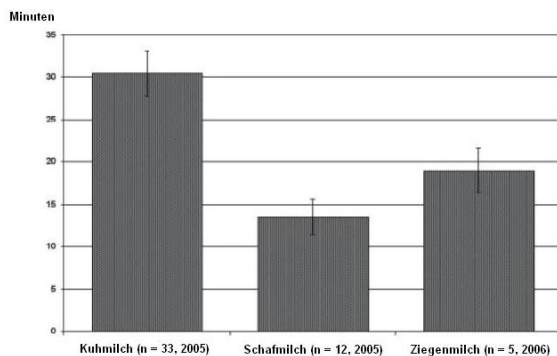


- (a) Angriff des Chymosins auf Caseinmizelle mit intaktem κ -Casein
- (b) Abspaltung des κ -Caseins
- (c) Aggregation der Caseine

Faktoren, welche die Labgerinnung beeinflussen, sind der Proteingehalt, eine mögliche Hitzebehandlung und/oder Kühlung, die Homogenisierung, die Einlabungstemperatur, der pH-Wert und der Calciumgehalt der Milch [FOX und McSWEENEY, 1997].

Schafmilch gerinnt nach dem Labzusatz schneller als Kuhmilch. Die gebildete Gallerte ist zudem deutlich fester. Abbildung 8 zeigt einen Vergleich der Gerinnungszeit von Milch unterschiedlicher Herkunft [RYFFEL und JAKOB, 2008].

Abbildung 8: Vergleich der Gerinnungszeit von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch [RYFFEL, 2008]



4.4 Bruchbearbeitung, Formen und Pressen

Der Bruch wird erwärmt und mit einer Käseharfe geschnitten, um das Austreten der Molke aus den Poren der Gallerte zu beschleunigen. Die Trockenheit des Bruches und somit des Käses hängt von der Größe der geschnittenen Würfel ab. So wird die Gallerte für die Erzeugung von Hartkäsen kleinwürfeliger geschnitten als die von Schnitt- oder Weichkäsen.

Für die Herstellung von mildem Käse wird der Bruch häufig gewaschen. Dabei wird ein Teil der Molke entfernt und durch Wasser ersetzt. Es entsteht ein osmotischer Gradient, der zu einer Abnahme von Milchzucker, Milchsäure und Salzgehalt führt.

Nach Abfüllen des Bruches in die Formen kann die eingeschlossene Molke abrinnen. Während eine bereits trockene Masse nur noch wenig Molke abgibt, verliert saurer Bruch durch die lockere Casein-Struktur durchaus noch beachtliche Mengen. Der Verlust an Wasser ermöglicht das Zusammenwachsen der Bruchkörner zu einem Kuchen [ALBRECHT-SEIDEL und MERTZ, 2006].

Die Konsistenz des Endproduktes einer Käsesorte kann aufgrund des Wassergehalts in der fettfreien Käsemasse wie folgt angegeben werden:

Extra hart:	< 51 %
hart:	49 – 56 %
semihart:	54 – 63 %
halbfest:	61 – 69 %
weich:	> 67 %

Eine Steigerung der Käseausbeute ist durch das Wiedereinbringen des abgeschiedenen Molkenproteins möglich. Es wurden hierfür Verfahren entwickelt, die zum Teil auch kommerziell Anwendung finden [BELITZ et al., 2008]. Durch Mikrofiltration, welche eine höhere Permeatleistung als Ultrafiltration aufweist, kann das Milchprotein und – fett aufkonzentriert werden, während Molkenproteine, Lactose, niedermolekulare Proteine und Salze die Membran mit einer Porenweite von 0,1 µm passieren. In einer

schweizerischen Studie konnte mithilfe dieser Methode die Trockensubstanz auf das 4-fache, der Fettgehalt auf das 6-fache und der Proteingehalt auf das 5-fache gesteigert werden. Dabei wird das Calcium mit aufkonzentriert und ist daher in den Produkten stark erhöht [SCHREIER und SCHAFROTH, 2007].

4.5 Salzen und Abtrocknen

Salzen von getrocknetem Käse fördert nicht nur einen weiteren Molkeaustritt, es dient auch der Geschmacksgebung und der Rindenbildung bei Trockensalzung. Es beeinflusst außerdem den Reifungsprozess, v.a. die primäre Proteolyse.

Um den Oberflächenmikroorganismen optimales Wachstum zu ermöglichen, wird der Käse vor der Reifung in einem belüfteten Raum getrocknet [ALBRECHT-SEIDEL und MERTZ, 2006].

4.6 Käsereifung

Im Reifungskeller erhält der Käse seine typischen Eigenschaften hinsichtlich Geschmack, Textur und Aussehen. Während der Reifung kommt es durch die natürlich vorhandenen bzw. zugesetzten Enzyme zum weiteren Ab- und Umbau der im Käse vorhandenen Moleküle. Je nach angestrebtem Endprodukt, d.h. dem gewünschten Wassergehalt und der Aromenbildung dauert die Reifung drei Wochen bis hin zu zwei Jahren oder sogar länger [FOX und McSWEENEY, 1997].

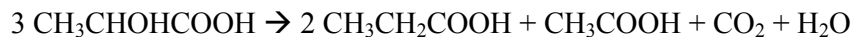
4.6.1 Abbau der Lactose

Säurekulturen verursachen einen Abfall des pH-Wertes von etwa 6,55 auf 5,15 in der Milch. In der Folge wird Lactose über mehrere Schritte homofermentativ zu Milchsäure abgebaut, wodurch in Hart- und Halbhartkäse kaum mehr Lactose nachgewiesen werden kann. Eine Ausnahme stellt kalt gereifter Käse, welcher noch Restmengen

enthält, dar [JAKOB et al., 2008]. Der Lactoseabbau führt außerdem zur Bildung kurzkettiger Moleküle, z.B. Diacetyl, Acetat, Acetaldehyd und Ethanol.

Durch Binden von Calcium wird Laktat gebildet, welches als Nahrungsquelle für Hefen, Schimmel oder Propionsäurebakterien dient. Der Lactoseabbau ist nach maximal 20 bis 30 Tagen abgeschlossen.

Wird zusätzlich mit Propionsäurebakterien beimpft, wie es beispielsweise bei der Erzeugung von Emmentaler der Fall ist, wird Milchsäure weiter zu Propionsäure umgesetzt. Dabei entstehen als Nebenprodukte Essigsäure und CO₂ [BELITZ et al., 2008]. Die Bilanzgleichung lässt sich folgendermaßen darstellen:



4.6.2 Lipolyse

Die Lipolyse spielt vor allem dort eine große Rolle, wo diverse Reifungskulturen eingesetzt wurden. Milchsäurebakterien besitzen eine nur schwach lipolytische Aktivität sowie die hitzelablen Lipasen der Rohmilch, welche bei Pasteurisierungstemperaturen inaktiviert werden. Triglyceride werden zum Teil zu Glycerin und freien Fettsäuren abgebaut. Vor allem kurzkettige Fettsäuren beeinflussen die Aromenbildung wesentlich [MARILLEY und CASEY, 2004].

4.6.3 Proteolyse

Die Proteolyse gilt als das primäre biochemische Ereignis während der Käsereifung und ist für die Geschmacksgebung und Konsistenzbildung von großer Bedeutung. An der Proteolyse sind Enzyme verschiedenen Ursprungs beteiligt. Es sind dies milcheigene Enzyme (Plasmin und Cathepsin D), Lab (Chymosin) bzw. Labersatzenzyme, Proteinasen und Peptidasen von sekundären Mikroorganismen (zum Beispiel Propionsäurebakterien), Proteinasen und Peptidasen von Starter-Kulturen (*Lactococcus*, thermophile Streptococci und Lactobacillen) und Enzyme von Nicht-Starter-Kulturen [SOUSA und MALCATA, 1997].

Für die Textur des Käses sind vorwiegend der pH-Wert und das Verhältnis zwischen der intakten Casein-Fraktion und dem Wassergehalt verantwortlich. Vor allem während der ersten zwei Wochen der Reifung kommt es zu einer Lockerung der Konsistenz, welche durch die Aktivität des Koagulanten hervorgerufen wird. Veränderungen in späteren Abschnitten der Reifung werden hauptsächlich durch die Lagerungstemperatur und durch die Verhältnisse von noch aktiven Labenzymen zum Plasmin und von Salz zum Wassergehalt beeinflusst. Je höher die Konzentration an aktiven Labenzymen im Käse, umso mehr nimmt die Elastizität des Bruches mit der Reifung ab. Diese hängt weiters vom pH-Wert und vom CCP ab [LAWRENCE et al., 1987].

Der Proteinabbau vollzieht sich als mehrstufiger Prozess. Die Endopeptidasen des in der Käsemasse verbliebenen Labs verursachen die Bildung von zunächst großen bis mittelgroßen Peptiden, welche von bakteriellen Proteinasen und Exopeptidasen weiter zu Oligo-, Di- und Tripeptiden bis hin zu freien Aminosäuren abgebaut werden [JAKOB, 2006]. Das Ausmaß der Proteolyse ist von folgenden Faktoren abhängig: den eingesetzten Starterkulturen und vom Koagulanten, dem Wasser- und NaCl-Gehalt, dem pH-Wert und der Reifungstemperatur [McGOLDRICK und FOX, 1999].

Einige Indizes zur Darstellung des Reifegrades für Käse wurden entwickelt, um letztendlich proteolytische Vergleiche innerhalb einer Käsesorte während des Reifeprozesses, aber auch zwischen den Käsesorten anstellen zu können [FOX und McSWEENEY, 1997]. Eine Klassifizierung des Proteolysegrades ist jedoch mit diversen Schwierigkeiten verbunden, da die Käsereifung als ein komplexes, dynamisches System gilt [SOUSA et al., 2001]. Es ist gekennzeichnet durch die individuelle Zusammensetzung des Ausgangsprodukts Milch und Enzymen verschiedenster Herkunft, deren umgesetzte Produkte anderen wiederum als Substrat dienen können [McSWEENEY und FOX, 1997].

Es sind zahlreiche Methoden zur Einschätzung der Proteolyse bekannt. Viele darunter sind jedoch sehr zeitaufwendig. Es bedarf daher effizienter Methoden, z.B. basierend auf einer Freisetzung bestimmter Komponenten oder reaktiver Gruppen, die mit einfachen Methoden messbar sind. Welche Methode letztendlich angewendet wird,

hängt von verschiedenen Faktoren, wie z.B. dem pH-Wert im Bruch oder den verwendeten Käsereihilfsstoffen ab [McSWEENEY und FOX, 1997].

Häufig angewendete analytische Methoden zur Beschreibung einzelner Parameter der Käsereifung sind die Fraktionierung der wasserlöslichen N-Substanzen und der freien Aminosäuren für Routineanalysen (unspezifische Analysen), Umkehrphasen-HPLC und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (spezifische Analysen).

Es sind verschiedene Formen der PAGE in Verwendung. So werden die Proteine bei der konventionellen Methode nach ihrer Ladung und Masse, bei der SDS-PAGE jedoch nur nach der Masse getrennt.

So kann während der ersten Koagulationsphase das gebildete para- κ -Casein via SDS-PAGE oder HPLC gemessen, oder aber das in TCA lösliche Glycomakropeptid mittels Kjeldahl-Methode, RP-HPLC oder durch eine Bestimmung der Konzentration von N-Acetylneuraminsäure quantifiziert werden [FOX et al., 2000]. Gleichzeitig kann mithilfe dieser Analysen die Reaktivität eines Koagulanten mit dem κ -Casein gemessen werden.

Je weiter die Proteolyse voranschreitet, umso mehr lösliche Peptide werden gebildet. Die Konzentration an löslichem Stickstoff steigt also kontinuierlich. Nach diesem Prinzip lässt sich das Ausmaß der Proteolyse bzw. die Aktivität der proteolytischen Enzyme einschätzen [McSWEENEY und FOX, 1997].

4.6.3.1 Fraktionierung der wasserlöslichen N-Verbindungen

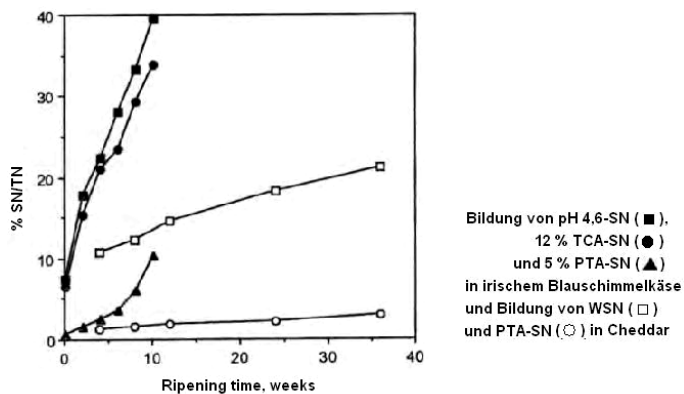
Die Fraktionierung wasserlöslicher N-Verbindungen ist eine weit verbreitete Methode, um das Ausmaß der Proteolyse zu bestimmen. Sie wird v.a. bei Käsesorten mit eher niedrigem und konstantem pH-Wert angewendet. Hierfür muss mittels Kjeldahl-Analyse zunächst der Gesamt-N-Gehalt (TN) ermittelt werden, um die wasserlösliche Fraktion (WSN) zu erhalten.

Der Großteil der **WSN**-Fraktion besteht meist aus durch Chymosin verursachten Spaltprodukten, zum Teil wird sie jedoch auch von Starterbakterien und Plasmin beeinflusst. Sie wird für gewöhnlich als Prozentanteil des Gesamt-N angegeben und steigt mit der voranschreitenden Käsereifung. Aus der WSN lässt sich die Trichloressigsäure-lösliche Fraktion (TCA-SN) und die Phosphorwolframsäure-lösliche Fraktion (PTA-SN) feststellen [ARDÖ, 1999].

Das Verhältnis von **TCA-SN** zu TN ist hauptsächlich von der Aktivität der Milchsäurebakterien, aber auch von der indogenen bakteriellen Milchflora abhängig. Die TCA-SN-Fraktion enthält hauptsächlich Peptide aus 2 bis 20 Aminosäureresten, aber auch freie Aminosäuren.

PTA-SN/TN ist ein Index für die gebildete Menge an freien Aminosäuren (FAA-Index) und wird hauptsächlich durch die Mikroorganismen im Substrat beeinflusst [CHEN et al., 2003].

Abbildung 9: Anstieg von SN mit dem Fortschritt der Käsereifung [McSWEENEY und FOX, 1997]



Neben der Ermittlung der WSN-Komponenten ist die Fraktion einer Citratdispersion eine weit verbreitete Methode, da sie einen proteolytischen Vergleich von Käsen, deren pH-Wert sich während der Käsereifung verändert, ermöglicht. Hierfür wird mittels Kjeldahl-Analyse aus der Dispersion wiederum TN ermittelt, um sodann durch Ansäuerung die lösliche Fraktion bei einem pH-Wert von 4,6 (pH 4,6-SN) bestimmen

zu können. Sie enthält dieselben Komponenten wie auch die WSN-Fraktion, jedoch ist der Proteinanteil völlig Casein-frei [ARDÖ, 1999].

Tabelle 1: Inhalt der WSN-, TCA-SN- und PTA-SN-Fraktionen [ARDÖ, 1999]

Fraktionierung	Inhalt
Wasser	Proteine (nur wenige Caseine), alle Peptide, Aminosäuren, Harnsäure, Ammonium
12 % TCA	Mittelgroße bis kleine Peptide, Aminosäuren und kleinere N-Verbindungen (z.B. Amine, Harnstoff und Ammonium)
PTA	sehr kleine Peptide, Aminosäuren und kleinere N-Verbindungen ausgenommen dibasischer Aminosäuren (Lys, Arg, Hist) und Ammonium

4.6.3.2 Umkehrphasen-HPLC

Die Umkehrphasen-HPLC ermöglicht die Analyse niedermolekularer Peptide. Peptidgemische werden dabei in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt. Bei der Umkehrphasen-HPLC besteht die stationäre Phase aus einer nicht polaren, hydrophoben Gruppe, die mobile Phase ist eine polare Substanz. Damit es zu einer Reaktion der Peptide mit den hydrophoben Seitenketten der stationären Phase kommt, muss zunächst die Polarität der Peptide reduziert werden. Hierfür wird der pH-Wert gesenkt, damit die β - bzw. γ -Carboxylgruppe der Aminosäuren undissoziiert bleibt [SINGH und CREAMER, 1990]. Die Peptide eluieren entsprechend ihrer Hydrophobizität nacheinander aus der Säule.

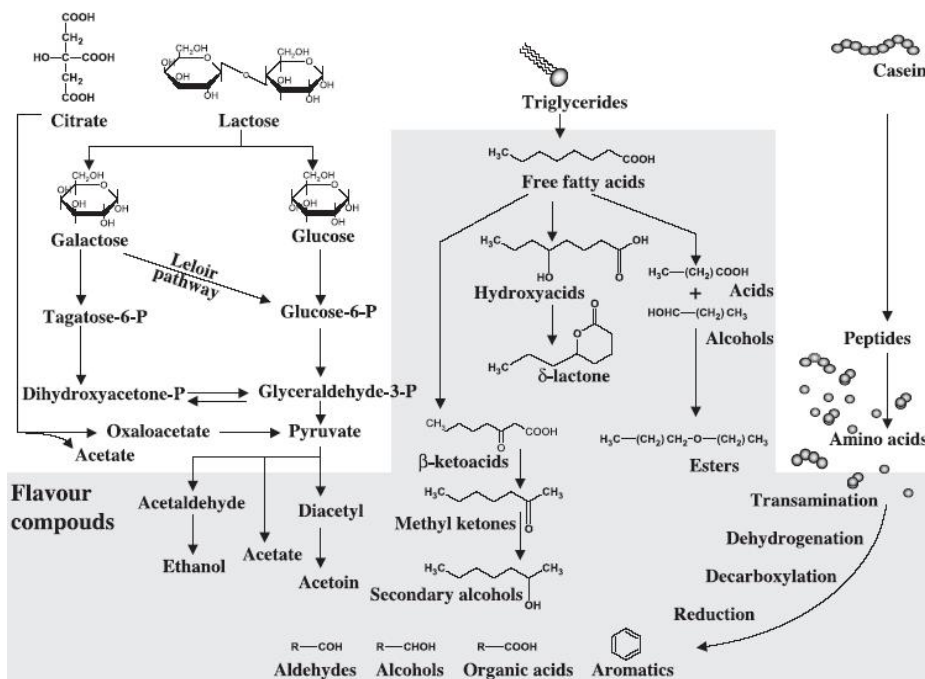
4.6.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gel, welches einen alkalischen Harnstoff-Puffer zur Erhöhung der Trennleistung enthält, ist die am häufigsten angewendete elektrophoretische Methode in der Analyse der Käsereifung. Sie dient zur Bestimmung von größeren Peptiden, welche in der primären Phase des Proteinabbaus gebildet werden [FOX und McSWEENEY, 1997].

4.6.4 Entwicklung von Aromen

Als Folge des Proteinabbaus entstehen niedermolekulare Verbindungen (< 500 Da): kleine Peptide, freie Aminosäuren und flüchtige Komponenten. Gemeinsam mit den freien Fettsäuren bzw. deren Abbauprodukten sind sie verantwortlich für den typischen „Grundgeschmack“ von Käse.

Abbildung 10: Biochemische Reaktionswege zur Aromenbildung [MARILLEY und CASEY, 2004]



Die Intensität des Käsearomas korreliert positiv mit der Konzentration der freien Aminosäuren. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der Menge bzw. den Relationen freier Aminosäuren und einem bestimmten Käsearoma. Die Käsesorten Cheddar, Gouda und Edamer etwa weisen zwar ähnliche Mengen und Relationen an Aminosäuren auf, sind aber geschmacklich sehr unterschiedlich.

Bittergeschmack entsteht durch die exzessive Akkumulation hydrophober Peptide. Ursache hierfür kann eine Überproduktion solcher, meist aus dem Abbau der β -Caseine

stammend, sein. Ein inadäquater Proteinabbau durch mikrobielle Enzyme kommt ebenfalls in Frage.

Die Analyse von Off-Flavors kann sehr zeitaufwendig sein, da die Konzentrationen dieser Substanzen meist im ppb-Bereich liegen. Sie können mittels GC, häufig gekoppelt mit MS nachgewiesen werden [SOUSA et al., 2001].

4.6.5 Beschleunigung der Käsereifung

Die Käsereifung ist ein langwieriger Prozess und daher mit hohem wirtschaftlichen Aufwand verbunden. Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Aromabildung zu beschleunigen [EL SODA, 1993].

Der Zusatz von Extrakten aus Lactobazillen oder technischen Enzympräparaten, welche Endo- und Exopeptidasen, Lipasen, Esterasen und andere Enzyme enthalten, nimmt stark zu. Eine Verwendung solcher Enzyme kann die natürliche Reifung um bis zu 50 % verkürzen. Die verschiedenen Präparate sind speziell auf eine bestimmte Käsesorte abgestimmt und werden entweder gemeinsam mit der Starterkultur oder dem Labpräparat in die Milch eingerührt oder aber erst später in den Käsebruch eingearbeitet. Letztere Methode verhindert einen allzu großen Verlust an Enzymen mit der Molke.

Qualität und Quantität des Käsebruchs sollen dabei nicht negativ beeinflusst werden. Es sind kaum Methoden zur praktischen Steuerung der beschleunigten Proteolyse bekannt. Folglich weisen solche Produkte aufgrund des exzessiven Proteinabbaus häufig atypische Geruchs- und Geschmacksmerkmale auf. Eine mögliche Verflüssigung der Caseinstruktur beeinflusst außerdem Textur und Konsistenz nachteilig [LÖSCHE, 2000].

5 KÄLBERMAGENLAB

Kälbermagenlab ist ein Enzymgemisch, das primär der Koagulation von Milchprotein im Abomasum dient und vom Milchkalb in hohen Konzentrationen produziert wird.

Es enthält die Endopeptidasen Chymosin und Pepsin im durchschnittlichen Verhältnis 9:1. Gemeinsam mit der Salzsäure vermögen diese die Nährstoffe der Milch, Caseine, Fette und andere Nährstoffe zurückzuhalten und gewährleisten so eine langsame Passage in den Dünndarm. Weiters kommen nicht aktive Enzyme als Begleitstoffe vor.

Die Chymosinproduktion in der Magenschleimhaut erreicht bei reiner Milchfütterung bis etwa zum zehnten Tag ein Optimum und sinkt mit zunehmendem Alter des Kalbes drastisch ab, während der Pepsingehalt steigt [KEHOE und HEINRICHS, 2004].

5.1 Herstellung

Als Ausgangsstoff werden gefrorene Kälbermägen herangezogen. Das Auftauen wird mithilfe der Dampfinkjektion beschleunigt. Es folgt die Extraktion unter Wasser- und Cellulosezugabe. Dieses Gemisch wird nun gepresst, bis man zwei Phasen (fest und flüssig) erhält. Durch eine Absenkung des pH-Wertes wird aus Prochymosin aktives Chymosin gebildet. Danach wird der pH-Wert neutralisiert und die flüssige Phase filtriert. Mittels Umkehrosmose wird das Filtrat konzentriert und schließlich konserviert. Es erfolgt eine Sterilfiltration, bevor es letztendlich zur Standardisierung, d.h. einer Einstellung der Enzymstärke und des Verhältnisses zwischen Chymosin und Pepsin, kommt.

Der Chymosinanteil im Lab muss laut Käseverordnung mindestens 25 % betragen und kann geringe Mengen an Schweinemagenpepsin beinhalten. Labextrakten kann weiters Lipase zugesetzt werden, welche bestimmten Käsesorten deren charakteristischen Geschmack verleiht [KAMMERLEHNER, 1999].

5.2 Komponenten

5.2.1 Chymosin

Chymosin besteht aus einer Polypeptidkette aus 323 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 35.600 Da. Es sind drei Isoenzyme, Chymosin A, B und C bekannt. Chymosin A und B unterscheiden sich im Aufbau lediglich durch zwei Aminosäuren [FOX und McSWEENEY, 1997]. In kommerziellen Lab-Präparaten kommen diese im Verhältnis 1:2 vor [LILLA et al., 2005]. Letzteres ist geringfügig weniger aktiv und enthält an Stelle 244 statt eines Asparaginsäure-Moleküls die Aminosäure Glycin.

Abbildung 11: Aminosäuresequenz des bovinen Präprochymosins, des Prochymosin A und des Chymosin A [TEUBER, 1997]

<i>+Präprochymosin</i>	<i>+Prochymosin</i>
MetArgCysLeuValValLeuLeuAlaValPheAlaLeuSerGlnGlyAlaGluIleThr	
ArgIleProLeuTyrLysGlyLysSerLeuArgLysAlaLeuLysGluHisGlyLeuLeu	
GluAspPheLeuGlnLysGlnGlnTyrGlyIleSerSerLysTyrSerGlyPheGlyGlu	<i>+Chymosin</i>
ValAlaSerValProLeuThrAsnTyrLeuAspSerGlnTyrPheGlyLysIleTyrLeu	
GlyThrProProGlnGluPheThrValLeuPheAspThrGlySerSerAspPheTrpVal	
ProSerIleTyrCysLysSerAsnAlaCysLysAsnHisGlnArgPheAspProArgLys	
SerSerThrPheGlnAsnLeuGlyLysProLeuSerIleHisTyrGlyThrGlySerMet	
GlnGlyIleLeuGlyTyrAspThrValThrValSerAsnIleLeuAspIleGlnGlnThr	
ValGlyLeuSerThrGlnGluProGlyAspValPheThrTyrAlaGluPheAspGlyIle	
LeuGlyMetAlaTyrProSerLeuAlaSerGluTyrSerIleProValPheAspAsnMet	
MetAsnArgHisLeuValAlaGlnAspLeuPheSerValTyrMetAspArgAsnGlyGln	
GluSerMetLeuThrLeuGlyAlaIle Asp ProCysTyrTyrThrGlySerLeuHisTrp	
ValProValThrValGlnGlnTyrTrpGlnPheThrValAspSerValThrIleSerGly	
ValValValAlaCysGluGlyGlyCysGlnAlaIleLeuAspThrGlyThrSerLysLeu	
ValGlyProSerSerAspIleLeuAsnIleGlnGlnAlaIleGlyAlaThrGlnAsnGln	
Tyr Asp GluPheAspIleAspCysAspAsnLeuSerTyrMetProThrValValPheGlu	
IleAsnGlyLysMetTyrProLeuThrProSerAlaTyrThrSerGlnAspGlnGlyPhe	
CysThrSerGlyPheGlnSerGluAsnHisSerGlnLysTrpIleLeuGlyAspValPhe	
IleArgGluTyrTyrSerValPheAspArgAlaAsnAsnLeuValGlyLeuAlaLysAla	
Ile.	

Biosynthese im Kälbermagen

Chymosin wird als Präprochymosin von den Zellen der Kälbermagenschleimhaut synthetisiert. Dieses enthält am N-terminalen Ende ein Signalpeptid. Es besteht zumeist aus 15 Aminosäuren und dient dem Transport des gesamten Moleküls durch die Membranen. Das Signalpeptid wird nach erfolgtem Transport abgespalten, es entsteht Prochymosin, aus welchem im sauren Milieu des Magens bei einem pH-Wert von etwa 2,5 durch autokatalytische Abspaltung eines weiteren Peptides irreversibel aktives Chymosin gebildet wird [TEUBER, 1997].

5.2.1.1 Spezifität in Käse

Primäre Proteolyse

Allgemein hat Chymosin bei einem pH-Wert von 5,5 und bei Temperaturen von 40 bis 42 °C sein Wirkungsoptimum. Unter diesen Bedingungen spaltet es in der primären Phase der Proteolyse mit hoher Spezifität die Bindung Phenylalanin₁₀₅ – Methionin₁₀₆ im κ -Casein. Die Produkte dieser Spaltung sind ein polares Glycomakropeptid (Sequenzabschnitt 106-169) und ein unpolares para- κ -Casein (Sequenzabschnitt 1-105). Die primäre Proteolyse wird ebenso als enzymatische Phase bezeichnet.

Hill (1968, 1969) führte Versuche zur Spezifität des Chymosins durch und stellte fest, dass es die Bindung Phe-Met weder im Di-, noch im Tri- oder Tetrapeptid, sehrwohl aber im Pentapeptid H.Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OMe spaltet. Die Hydrolyse ist somit von der Länge des Peptids und von der Aminosäuren-Sequenz im Bereich dieser Bindung abhängig [FOX und McSWEENEY, 1997]. Ebenso wird die relative Geschwindigkeit, mit der das Lab Phe₁₀₅-Met₁₀₆ im κ -Casein hydrolysiert, von der Länge und der Sequenz des Peptids beeinflusst (s. Tab. 2) [BELITZ et al., 2008].

Sekundäre Proteolyse

Sobald etwa 85 % des vorhandenen κ -Caseins hydrolysiert sind, aggregiert das unpolare para- κ -Casein mit den übrigen Caseinen zum Gel. Aus diesem Grund wird dieser

Abschnitt der Proteolyse als Koagulationsphase bezeichnet. Das Glycomakropeptid tritt hauptsächlich in die Molke über.

Etwa 6 % des zur Milch zugefügten Chymosins verbleibt im Gel. Hier hydrolysiert es im α_{s1} -Casein primär die Bindung Phe₂₃-Phe₂₄. Hieraus resultiert die weiche Textur des Käses. Das dabei entstehende Peptid (α_{s1} -Casein f1-23) wird rasch durch die Proteinasen von Starterkulturen hydrolysiert. Die Hydrolyse des α_{s1} -Caseins wird durch NaCl stimuliert. In Cheddar Käse beispielsweise wird es komplett zu α_{s1} -I Casein (f24-199) abgebaut. Im α_{s2} -Casein ist die Spaltung durch Chymosin auf die hydrophoben Regionen beschränkt.

Die Wirkung auf β -Casein wurde in einem 0,05 M Natriumacetat-Puffer geprüft. Folgende Bindungen wurden darin hydrolysiert: Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, Ala₁₈₉-Phe₁₉₀, Gln₁₆₇-Ser₁₆₈, Leu₁₆₃-Ser₁₆₄ und Leu₁₃₉-Leu₁₄₀. Dies führt zur Bildung großer Peptide, nämlich β -Casein II (f1-192), β -Casein III (f1-189), β -Casein II (f1-163/4/5) und β -Casein III (f1-139). Bei einem pH-Wert von 2 – 3 wird zusätzlich Leu₁₂₇-Tyr₁₂₈ gespalten. Das Produkt hiervon wird als β -Casein IV (f1-127) bezeichnet.

Ein Abbau des β -Caseins bishin zu kleinen C-terminalen, hydrophoben Peptiden, den Bitterpeptiden (f193-209 und f190-209) führt im Käse zum Fehl aroma „bitter“.

Die Hydrolyse von β -Casein durch Chymosin ist stark abhängig von verschiedenen Faktoren. So ist diese bei niedrigeren Temperaturen stärker ausgeprägt als jene von α_{s1} -Casein. Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 5 % kann sie jedoch stark eingeschränkt werden, 10 % unterdrücken sie gar komplett.

Bei der Herstellung verschiedener Hartkäsesorten wird die dickgelegte Milch während des Käsungsprozesses höheren Temperaturen (etwa 60 °C) ausgesetzt, welches eine teilweise Inaktivierung des Koagulanten hervorruft. In diesem Fall spielt Plasmin eine signifikante Rolle in der Käsereifung. Es hydrolysiert β -Casein zu γ -Casein und Proteosepepton, weiters α_{s2} -Casein und in geringem Ausmaß α_{s1} -Casein [FOX und McSWEENEY, 1997].

Sousa und Malcata (1997) verglichen anhand eines Urea-PAGE-Elektrophoretogrammes die hydrolytische Aktivität eines kommerziellen Kälbermagenlabs bzw. eines pflanzlichen Extraktes (*Cynara cardunculus*) im Bezug auf die ovinen Caseine.

Dabei wurden die α_s -Caseine bevorzugt hydrolysiert; in der Schafkäseprobe, welche mit *C. cardunculus* hergestellt wurde, nur zu ca. 47 %, hingegen in jener, welche mit Naturlab hergestellt wurde, zu ca. 88 %. Beide Proteasen spalten im ovinen α_s -Casein die Bindung Phe₂₃-Val₂₄.

Für die β -Caseine lagen die Werte bei etwa 33 % für die Probe mit *C. cardunculus* und bei etwa 50 % für die Probe mit dem Naturlab. Die Proteinasen im ovinen β -Casein spalten die Bindung Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ und Ala₁₈₇-Phe₁₈₈ [SOUSA und MALCATA, 1997].

Tabelle 2: Relative Geschwindigkeit der Hydrolyse von Peptiden aus der κ -Casein-Aminosäuresequenz durch Lab [BELITZ et al., 2008]

Substrat	Sequenz	v_{rel}^a
Phe-Met	105 – 106	0,00
Ser-Phe-Met-Ala-Ile	104 – 108	0,04
Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro	104 – 109	0,11
Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile	103 – 108	21,6
His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile	102 – 108	31
Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro	103 – 110	100
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile	101 – 108	100
His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys	98 – 112	2500

5.2.2 Pepsin

Die Mukosa des bovinen Labmagens sezerniert Pepsin A und Pepsin B, wobei Pepsin A ab der Geburt des Kalbes bis etwa zum 44. Tag relativ konstant und in großen Mengen vorkommt. Gemeinsam mit Chymosin vermag es die Milch ausreichend zu koagulieren. Pepsin B wird erst nach der Milchentwöhnung gefunden und steigt mit der Trockensubstanzaufnahme [KEHOE und HEINRICHS, 2004].

Anders als Chymosin hat Pepsin ein Optimum bei einem pH-Wert von etwa 2. Seine Aktivität spielt daher bei saureren Käsesorten eine größere Rolle.

6 LABERSATZENZYME

Seit den 1970ern wurden zahlreiche Studien über die Eigenschaften tierischer, mikrobieller und pflanzlicher Labersatzenzyme im Vergleich zum Kälbermagenlab bzw. Chymosin publiziert. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe saurer Proteinasen, welche ebenfalls in der Lage sind, die hydrophobe Bindung Bindung Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ im κ -Casein zu hydrolysieren [FOX et al., 2000].

Es existieren nicht nur in vitro-Tests, in denen deren proteolytische Aktivitäten auf die Caseine nachgewiesen werden, sondern auch praktische Versuche, welche Aussagen über andere Aspekte im Bezug auf Käsequalität und –quantität zulassen. Somit liegt grundsätzlich eine Reihe an spezifischen Daten vor.

Eine große Herausforderung stellt es jedoch dar, die Auswirkungen eines Präparats bestimmten Ursprungs zu vergleichen, da vor allem bei der praktischen Anwendung viele verschiedene Faktoren auf ein Produkt einwirken.

Einerseits beeinflussen die Zusammensetzung des Rohstoffes Milch und die eingesetzten Käsereihilfsstoffe, wie etwa die gewählte Säuerungskultur und ein etwaiger Zusatz von CaCl₂ den Käse. Andererseits trägt auch das angewendete Extrakt letztendlich zur Charakteristik des Produktes bei. Extrakte unterliegen oft Schwankungen. So enthält etwa Naturlab, wenn nicht ausdrücklich deklariert, unterschiedliche Verhältnisse von Chymosin und Pepsin und in mikrobiellen Präparaten können Produktionsrückstände oder aber auch die Käseerzeugung negativ beeinträchtigende Enzyme vorkommen. Die vielfältigen Möglichkeiten zur Gewinnung pflanzlicher Extrakte führen außerdem zu unterschiedlichen Resultaten und letztendlich beeinflusst die Wahl der Methode zur Analyse verschiedener Qualitätsparameter qualitative und quantitative Messergebnisse.

Im Folgenden sollen einige wissenschaftlich dokumentierte Präparate zunächst vorgestellt werden, um Vergleiche anhand ausgewählter Studien, auch untereinander anstellen zu können und die Problematik, die sich hierbei ergibt, aufgezeigt werden.

6.1 Tierische Labersatzenzyme

6.1.1 Schweinepepsin

Pepsin wird in der Magenmukosa von Schweinen als inaktives Pepsinogen produziert. Bei der Aktivierung zu Pepsin kommt es zur Abspaltung von sieben bis neun Peptidbindungen. Es hat ein pH-Optimum von ca. 2 und ist daher im Käse (pH-Wert ca. 6,6) inaktiv. [JOHNSON, 1988] Schweinepepsin hydrolysiert präferentiell die Bindung Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ im κ -Casein [FOX et al., 2000]. Seine Spezifität im Bezug auf die proteolytische Aktivität auf α_{s1} - und β -Casein ähnelt jener des bovinen Pepsins. [JOHNSON, 1988]

6.1.2 Hühnerpepsin

In Israel ist die Erzeugung von Käse mithilfe von Hühnerpepsin seit den 1970ern weit verbreitet. Seine proteolytische Aktivität im Vergleich zu Chymosin höher und hitzelabiler. Der Einsatz von Hühnerpepsin in der Cheddar Käse-Produktion war im Rahmen zahlreicher Studien weniger erfolgreich. Bemängelt wurden unter anderem der erhöhte Verlust an Stickstoff mit der Molke, die Konsistenz des Bruches und die Entwicklung des Fehl aromas „bitter“ nach dreimonatiger Reifung. [JOHNSON, 1988]

6.2 Mikrobielle Labersatzenzyme

Mikrobielle Labersätze sind von Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen und Pilzen synthetisierte proteolytische Enzyme. Wie auch Chymosin und Pepsin zählen die auf diese Weise gewonnenen Enzyme aufgrund zweier Asparaginsäurereste im katalytisch aktiven Zentrum zur Gruppe der Aspartproteasen.

Bereits in den 1970ern und vor der Etablierung der Anwendung von rekombinantem Lab wurden die Proteasen von *Rhizomucor miehei* und *Cryphonectria parasitica* – anfänglich als Mischung mit Naturlab und schon bald als komplettes Substitut - für etwa

60 % des in den USA erzeugten Käses eingesetzt (Naturlab für etwa 15 %, Schweinepepsin für etwa 25 %) [STERNBERG, 1976]. Über das Ausmaß der Anwendung in Europa sind zwar keine exakten Zahlen bekannt, es wird jedoch geschätzt, dass sie in Deutschland derzeit bei über 50 % liegt [oekolandbau.de, 2008].

6.2.1 Aspartatproteasen aus Pilzen

Mit der Einführung dieser Gruppe von Labaustauschstoffen in der Käserei wurden von internationalen milchwirtschaftlichen Institutionen verschiedene Anforderungen an diese gestellt. So mussten die Präparate frei von pathogenen und toxischen Wirkungen sein, wobei als Nährmedium für die Gewinnung ein Lebensmittel zu verwenden sei. Im Vergleich zu tierischem Lab solle das Coagulum die gleichen physikalischen Eigenschaften besitzen und die Käseausbeute solle mindestens der bei Verwendung von tierischem Lab entsprechen. Der Fettverlust solle niedrig sein und letztendlich sollen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geschmack und Textur auftreten [STAVLUND und KIERMEIER, 1973].

6.2.1.1 Herstellung

Aspartatproteasen können mithilfe verschiedener Pilzstämme produziert werden. *Rhizomucor pusillus* wurde anfänglich durch Oberflächenanzucht auf halbfesten Kulturmedien mit 4 % Kartoffelstärke, 3 % Sojamehl und 10 % Gerste gewonnen. Für die Gewinnung von Proteasen aus *Rhizomucor miehei* und *Cryphonectria parasitica* wird die Technologie der Submersfermentation im flüssigen Nährmedium bevorzugt. Gemeinsam mit der Protease sekretieren diese Mikroorganismen eine Lipase, welche durch eine Senkung des pH-Wertes inaktiviert wird [FOX, 1993]. Die gewonnene Mischung enthält außerdem weitere Enzyme, wie Cellulasen und β -Galactosidasen, welche den Käsungsprozess negativ beeinflussen können und deshalb entfernt werden müssen [STERNBERG, 1976].

Die industriell hergestellten mikrobiellen Proteasen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Kommerzielle mikrobielle Labaustauschstoffe [STERNBERG, 1976]

Mikroorganismus	Markenname	Vertrieb
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Suparen	Pfizer International
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Sure-Curd	Pfizer, Inc.
<i>Cryphonectria miehei</i>	Fromase	Wallenstein Company
<i>Rhizomucor miehei</i>	Hannilase	Chr. Hansen's Laboratory, Inc.
<i>Rhizomucor miehei</i>	Marzyme	Miles Laboratories, Inc.
<i>Rhizomucor miehei</i>	Rennilase	Novo Industry A/S
<i>Rhizomucor pusillus</i> var. Lindt	Emporase	Dairyland Food Laboratories, Inc.
<i>Rhizomucor pusillus</i> var. Lindt	Meito MR	Meito Sangyo
<i>Rhizomucor pusillus</i> var. Lindt	Noury Rennet	Vitex

6.2.1.1.1 Eigenschaften

Die etablierten, kommerziell angewendeten Pilz-Proteasen sind dem Chymosin relativ ähnlich. Die Qualität der meisten mit den kommerziellen Präparaten hergestellten Käsesorten ist weitgehend nicht zu bemängeln [KAMMERLEHNER, 1999].

Dennoch sind die unter 6.1.1. genannten Anforderungen mit einer Reihe von Problemen verbunden. Viele Präparate sind toleranter gegenüber hohen Temperaturen und besitzen ein hohes Maß an unspezifischen proteolytischen Aktivitäten. Dies führt zu einem exzessiveren Proteinabbau unter Bildung von Peptiden und in der Folge zu einer geringeren Ausbeute.

6.2.1.1.2 Spezifität der Proteolyse und Käseausbeute

Enzyme aus *Rhizomucor pusillus* und *Rhizomucor miehei* spalten zwar ebenfalls primär die Bindung Phe₁₀₅-Met₁₀₆, die Protease aus *C. parasitica* bevorzugt jedoch die Bindung Leu₁₀₄-Phe₁₀₅. Zusätzlich sind diese Enzyme für eine Reihe von unspezifischen proteolytischen Reaktionen, welche negativ beurteilt werden, verantwortlich. Die Relation zwischen der spezifischen Aktivität und den unspezifischen Aktivitäten liegt für *Rhizomucor*-Präparate bei etwa 1:2 und für das Produkt aus *C. parasitica* sogar bei etwa 1:67. Im Vergleich dazu liegt das Verhältnis für Kälbermagenlab bei 1,4:1. Die mögliche Bildung vieler niedermolekularer Peptide führt dazu, dass diese in die Molke übertreten und folglich die Käseausbeute reduziert wird. Dieser Verlust im Vergleich zum Kälbermagenlab mit der höchsten Käseausbeute wurde durch Emmons et al. wie folgt beschrieben: -0,49 % (+/-0,11) bei Lab aus *R. pusillus*, -0,63 % (+/-0,11) bzw. -

0,68 % (+/-0,12) bei zwei verschiedenen Labpräparaten von *R. miehei* und -1,24 % (+/-0,32) bei Lab aus *C. parasitica* [KAMMERLEHNER, 1999]. Eine höhere Käseausbeute kann jedoch durch CaCl_2 -Gaben erreicht werden [ZICKRICK, 1996].

Chen et al. (2003) verglichen im Rahmen einer Studie ebenfalls die Effekte verschiedener Labpräparate auf die Käseausbeute unter Verwendung von Schafmilch. Dabei analysierten sie den Trockenmassegehalt in der angefallenen Molke, welcher ein Indikator für die Käseausbeute ist. Während die Werte bei den Proben, welche mit *C. cardunculus* und Kälberlab hergestellt wurden, vergleichbar waren, wies die Probe, welche mit einem mikrobiellen Labpräparat aus *R. miehei* (Microlant) erzeugt wurde, einen signifikant höheren Wert auf, was schließlich eine geringere Käseausbeute nach sich zog.

Andererseits verglichen Dinesen et al. (1975) Cheddar-Käse, welcher einerseits mit *R. miehei* und Kälberchymosin in drei verschiedenen Käsefabriken produziert wurde. Obwohl anfänglich Käse, der mit Chymosin hergestellt wurde, eine stärkere Aromenintensität aufwies, zeigten sich ab einer Reifungsdauer von 6 Monaten keine Unterschiede mehr. Der NPN-Gehalt in der Molke, welche durch die Verwendung des mikrobiellen Labs anfiel, war jedoch höher, was auf eine ausgeprägtere proteolytische Aktivität zurückzuführen ist [STERNBERG, 1976].

6.2.1.1.3 Ausmaß der Casein-Hydrolyse

Tam und Whitaker (1972) verglichen die hydrolytischen Aktivitäten von Chymosin aus Naturlab, Schweinepepsin und den Proteasen aus *C. parasitica* und *R. pusillus* auf bovine α -, β - und κ -Caseine bei 30 °C und verschiedenen pH-Werten.

Alle vier Enzyme wiesen eine relativ langsame initiale Hydrolyse von β -Casein, welche für die Bildung von Bitterpeptiden verantwortlich gemacht wird, auf, wobei die Proteinase von *C. parasitica* hierbei geringfügig aktiver als die der anderen Enzyme war. Die Aktivitäten schienen stark mit dem pH-Wert zu korrelieren. So wurde β -Casein bei einem pH-Wert von 6 durch *C. parasitica* am aktivsten hydrolysiert, gefolgt

von Chymosin und schließlich *R. pusillus*. Bei einem pH-Wert von 5,5 zeigte sich außerdem eine signifikant stärkere Hydrolyse als bei einem pH-Wert von 6 [TAM und WHITAKER, 1972].

6.2.1.1.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Enzymaktivität

Die mikrobiellen Präparate unterscheiden sich untereinander in ihrer Sensibilität hinsichtlich Temperatureinflüssen, Ca^{2+} -Konzentrationen, pH-Wert und Fließeigenschaften bei der Gelbildung der Milch.

Die Zeitspanne zwischen dem Zusatz eines Koagulanten bis zur sichtbaren Milchgerinnung variiert in Abhängigkeit vom eingesetzten Enzym bzw. der Enzymmischung und der Ca^{2+} -Konzentration. So wurde in einigen Studien festgestellt, dass *C. parasitica* am wenigsten und *R. pusillus* am stärksten sensitiv gegenüber Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration in der Milch ist. Kälberchymosin und *R. miehei* verhalten sich bei einem pH-Wert von 5,55 bis 6,85 ähnlich [STERNBERG, 1976].

Obwohl kaum Unterschiede zwischen Chymosin und Pilzproteinasen hinsichtlich des pH-Optimums bestehen, unterscheiden sie sich dennoch im Temperaturoptimum. Es liegt für Enzyme aus Pilzen bei ca. 60 °C um 20 °C höher als das von Chymosin und anderen mikrobiellen Koagulanten. Daher werden diese heutzutage durch Oxidation destabilisiert, um die Resistenz gegenüber höheren Temperaturen zu senken und damit deren unspezifische proteolytische Aktivitäten zu senken [JAROS et al., 2008].

6.2.2 Aspartatproteasen aus Bakterien

Eine kommerzielle Produktion von Milchkoagulanten aus Bakterienstämmen verglichen mit der aus Pilzen schien in den 1970ern aufgrund der kürzeren Fermentationszeit zwar vorteilhaft, jedoch konnten kaum ideale Methoden dazu entwickelt werden. Die Proteasen bekannter Bakterienstämme sind mit einer Reihe von unspezifischen proteolytischen und vielfältigen Reaktionen assoziiert. Einige zufriedenstellende Ergebnisse über die Anwendung von Milchkoagulanten bakteriellen Ursprungs lassen

sich dennoch in der Literatur finden. Es sind dies beispielsweise Versuche mit den Proteasen der *Bacillus*-Stämme *cereus*, *polymyxa* und *subtilis* [STERNBERG, 1976].

6.3 Chymosin aus genmodifizierten Mikroorganismen

Seit Ende der 1980er wird Chymosin industriell aus genmodifizierten Mikroorganismen hergestellt. Schätzungen zufolge wird für 70 % der in den USA hergestellten Käsen Chymosin aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen eingesetzt [LILLA et al., 2005]. Ebenso ist in Großbritannien kaum mehr Kälbermagenlab im Einsatz. Mikrobielle Enzyme hatten bis 2000 einen Marktanteil von etwa 40 %, GVO-Lab etwa 60 % [COENEN, 2000]. In Deutschland ist die Anwendung seit 1997 für konventionell produzierten Käse erlaubt, ebenso ist sie in Österreich zulässig. Der Zusatz von GVO-Lab als technischer Hilfsstoff unterliegt keinerlei Deklaration, da homologisches Klonen als natürlich gilt und das Produkt selbst kein gentechnisch verändertes Material enthält [GMO Compass, 2008].

6.3.1 Herstellung

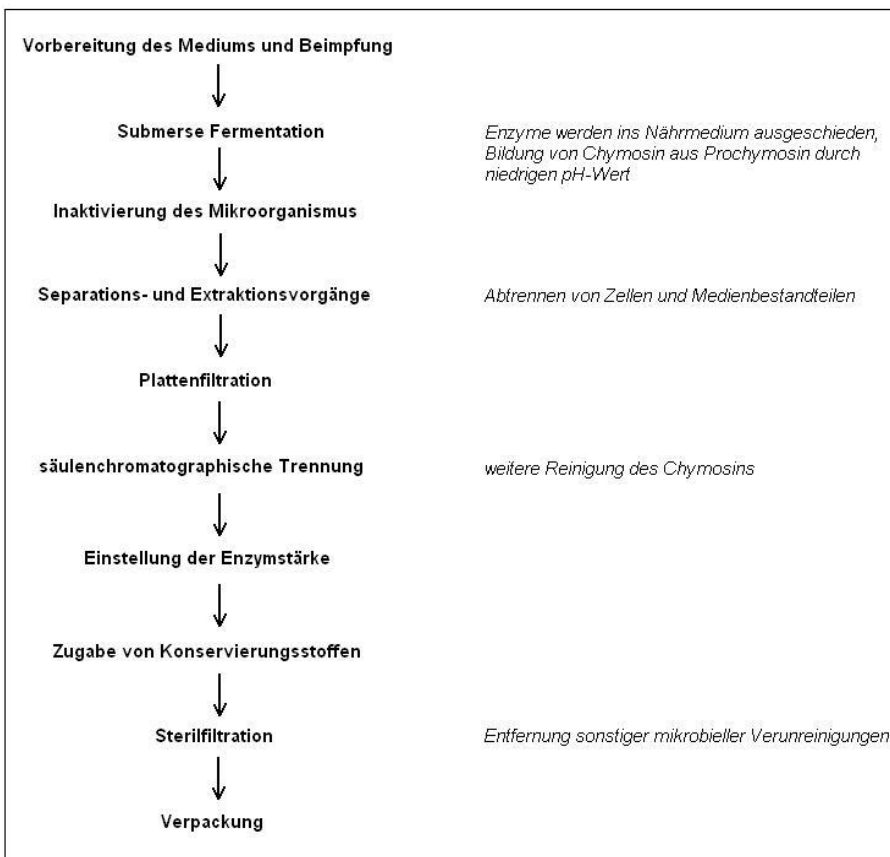
Zunächst wird die mRNA für Prochymosin aus der Magenschleimhaut des Kalbes isoliert und in die komplementäre cDNA umgeschrieben. Für den Transport der Information in einen Mikroorganismus muss die cDNA in ein geeignetes Trägermolekül, welches im Reagenzglas hergestellt wird, eingebaut werden. Dieses wird durch Transformation in den Mikroorganismus eingeführt. In einem Fermenter kommt es hier zur Vermehrung und zur Expression der Prochymosin-DNA. Die noch enzymatisch inaktiven Eiweißmoleküle werden vom Nährmedium abgetrennt und mithilfe der Ultrafiltration gereinigt.

Bei der Verwendung von *Escherichia coli* lagern sich die produzierten Prochymosinmoleküle als Kristalle im Zellinneren ab. Zur Extraktion dieser Einschlusskörperchen muss die Zellwand des Mikroorganismus zerstört werden. Rekombinante DNA als Rückstand wird mithilfe schwacher Säure (pH 1,6) denaturiert.

Somit erhält man Präparate, die frei von gentechnisch modifizierten Produktionsorganismen sind. Um eine Umfaltung von Prochymosin einzuleiten, wird es mit Harnstoff behandelt und anschließend für die Käseherstellung standardisiert [TEUBER, 1997].

Heute befinden sich drei auf diese Weise hergestellte Produkte, unter Verwendung der Mikroorganismen *Kluyveromyces lactis* (Maxiren), *Aspergillus niger* var. awamori (Chymogen) und *Escherichia coli* (Chy-Max) auf dem Markt [LILLA et al., 2005].

Abbildung 12: Fließbildschema zur Herstellung von CHY-MAX [KAMMERLEHNER, 1999]



6.3.2 Eigenschaften

Rekombinantes Chymosin unterscheidet sich vom Chymosin natürlichen Kälberlafs nicht. Es enthält jedoch entweder nur das A- oder B-Isomere der Isoenzyme und ist in der Zusammensetzung reiner. Für den Käsehersteller bedeutet der Einsatz rekombinanten Chymosins enorme finanzielle Einsparungen, da einerseits kleinere Dosen für die Gelbildung erforderlich sind und andererseits die Käsungszeit aufgrund der stärkeren und schnelleren Bruchfestigung verkürzt wird. Da die Proteolyse reinen Chymosins eingeschränkt ist, konnten in verschiedenen Studien geringere Qualitätsverluste mit fortschreitendem Alter im Vergleich zum mit Kälberlab hergestelltem Käse beobachtet werden [KAMMERLEHNER, 1999].

6.4 Pflanzliche Labersatzenzyme

Einige Proteasen pflanzlichen Ursprungs besitzen dem Lab ähnliche Eigenschaften und werden ebenfalls zu den Aspartproteasen gezählt. Die meisten dieser Proteasen besitzen eine weitere Gruppe bestehend aus etwa 100 Aminosäureresten, welche keine Ähnlichkeit zu den Proteinase tierischer bzw. mikrobieller Herkunft hinsichtlich der Sequenz aufweist [SOUSA und McSWEENEY., 2001]. Es sind dies Extrakte aus verschiedenen Pflanzenteilen von *Cynara cardunculus* (Cardosin A und B) und *Ficus carica*, den unreifen Früchten von *Carica papaya* (Papain), dem Stamm von *Ananas sativa* (Bromelin) und den Samen von *Ricinus communis*. Die Enzyme und deren Wirkungen auf die Milchproteine wurden im Rahmen einiger wissenschaftlicher Studien beschrieben. Weiters findet man in der Literatur u.a. *Galium verum*, *Centaurea calcitrapa*, *Pinguicula vulgaris*, *Ranunculus flammula*, *Solanum incanum* und *Withania somnifera* als Quellen für pflanzliche Milchgerinnungsenzyme.

Galium verum beispielsweise, auch als echtes Labkraut bekannt, gehört zur Familie der Rubiaceae und wächst im europäischen und asiatischen Raum auf trockenen, kalkarmen Wiesen, Wegrainen und Äckern. Ihr Extrakt wurde bis etwa zum 19. Jahrhundert in Groß-Britannien zur Erzeugung von Cheshire und Gloucester Käse verwendet, wo seine

Funktion neben der des Koagulierens der Milch in der gelb-orangen Farbgebung des Käses lag [TOUSSAINT-SAMAT, 1994].

Die Verwendung pflanzlichen Labs hat heute eher traditionelle und regionale Gründe und wird vor allem im Mittelmeerraum im Bereich der Hofkäserei für die Käseproduktion aus Schaf- und Ziegenmilch herangezogen.

Eine Etablierung dieser Gruppe von Enzymen für die Käseerzeugung blieb aufgrund der Entwicklung anderer und zum Teil geeigneterer Alternativen aus, wissenschaftliche Literatur über die Proteinasen der genannten Pflanzen ist somit nur begrenzt bzw. nicht verfügbar.

6.4.1 Herstellung

Zur Herstellung der Extrakte wurden verschiedene Methoden beschrieben, es existiert kein standardisiertes Verfahren. So werden von *Cynara Cardunculus* beispielsweise entweder die gesamten Pflanzen, Stiele und/oder Blüten sowohl in frischer als auch in getrockneter Form verwendet. Für *Carica papaya* oder *Ficus carica* werden die Pflanzenteile zu feinem Pulver gerieben.

Die Proteasen werden entweder mit destilliertem Wasser, gemeinsam mit NaCl oder mit 0,1 M Zitronensäure extrahiert, homogenisiert, filtriert und zentrifugiert. Eventuell erfolgt eine Reinigung mithilfe chromatographischer Verfahren oder aber mit Ammoniumsulfat [CHEN et al., 2003].

6.4.2 Eigenschaften

6.4.2.1 *Cynara cardunculus*

Die Enzyme von *Cynara cardunculus* sind wohl die am häufigsten untersuchten pflanzlichen Koagulantien. *C. cardunculus* ist mit der wilden Artischocke verwandt und gehört zur Familie der Asteraceae. Sie wächst auf trockenem, unkultiviertem Boden, in

Regionen mit mediterranem Klima, wo ihre Fähigkeit des Koagulierens der Milch seit Jahrhunderten bekannt ist. Hauptsächlich dient *C. cardunculus* der Produktion von Weichkäse aus Schafmilch, weniger aus Ziegen- und Kuhmilch. Beispiele sind etwa die Herstellung der Sorten Serra da Estrela, Serpa, Los Pedroches und La Serena [O'MAHONI et al., 2003].

In den 1970ern wurden ihre proteolytischen Enzyme identifiziert und als Cardosin A (75 – 90 %) und Cardosin B (10 – 25 %) bezeichnet. Beide kommen hauptsächlich im weiblichen Teil der Pflanze vor, wobei Cardosin B auch in den unteren Teilen nachweisbar ist [CHEN et al., 2003].

Abbildung 13: *Cynara cardunculus* [www.soc-botanical-artists.org]

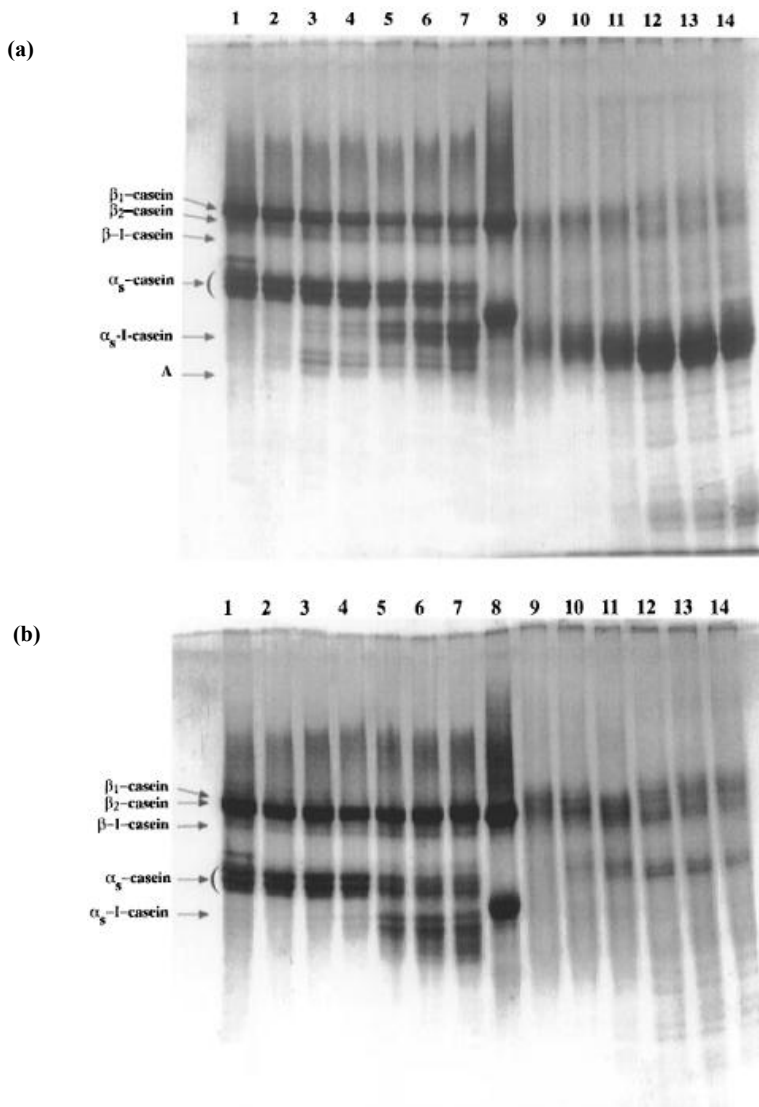


6.4.2.2 Spezifität und Ausmaß der Proteolyse

Die Spezifität des in *C. Cardunculus* enthaltenen Cardosin A ähnelt der des Kälberchymosins, die des Cardosin B der des Kälberpepsins im Bezug auf deren hydrolytische Aktivität. Das Optimum der Proteasen liegt bei einem pH-Wert von 5,1 – 5,9, wo sie im κ -Casein ebenfalls primär die Bindung Phe₁₀₅-Met₁₀₆ des Milchproteins spalten [CHEN et al., 2003].

Im bovinen α_{s1} -Casein hydrolysieren beide Cardosine zunächst die Bindung Phe₂₃-Phe₂₄. Diese Spaltung verursacht auch eine weichere Textur des Bruches [O'MAHONY et al., 2003]. Die Hydrolyse der bovinen β -Caseine durch die Proteinase von *C. cardunculus* erfolgt an der Bindung Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ und Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ [SOUSA und MALCATA, 1997].

Abbildung 14: Urea-PAGE-Elektrophoretogramme (12,5 % T, 4 % C; pH 8,9) der Fraktionen WISN (Streifen 2-7) und WSN (9-14) an den Reifungstagen 0, 7, 14, 28, 42 und 68 für Schafmilchkäse, hergestellt mit einem Extrakt aus *C. cardunculus* (a) und Kälbermagenlab (b). Als Referenz dient bovines (8) und ovines (1) Natriumcaseinat. [SOUSA und MALCATA, 1997]



Sousa und Malcata (1997) verglichen im Rahmen einer Studie die caseinolytische Aktivität von *C. cardunculus* und Kälbermagenlab in der Schafkäseerzeugung. Das Urea-PAGE-Elektrophoretogramm zeigte, dass die korrespondierende Bindung Phe₂₃-Val₁₂₄ im α -Casein von beiden Präparaten bevorzugt hydrolysiert wurden. Bei der Hydrolyse der Bindungen Leu₁₉₀-Tyr₁₉₃ und Ala₁₈₇-Phe₁₈₈ im β -Casein zeigten sich Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem natürlichen Lab. Während diese in den Proben, mit *C. cardunculus* hergestellt, zu etwa 33 % abgebaut wurden, waren in den Proben, welche mit dem Kälberlab erzeugt wurden, immerhin etwa 50 % hydrolysiert [SOUSA und MALCATA, 1997].

6.4.2.3 Sensorische Analysen

Chen et al. (2003) verglichen im Rahmen einer Studie sensorische Parameter von Pecorino Käse, der aus Schafmilch mit einem Extrakt aus *C. cardunculus*, einem mikrobiellen Präparat (Microlant) und Kälberlab (Naturen) hergestellt wurde.

Eine Gruppe von geschulten Sensorikern (n = 12) bewertete dabei folgende Faktoren der drei Produkte: Festigkeit, Cremigkeit, Bitterkeit und den Gesamteindruck. Auch eine Verbrauchergruppe wurde für diese Studie befragt (n = 287).

Der Gesamteindruck des mit *C. cardunculus* hergestellten Käses wurde dabei sowohl von der Gruppe der geschulten Sensoriker als auch von der befragten Verbrauchergruppe am besten bewertet. Er überzeugte mit seiner Cremigkeit, welche während der 90-tägigen Reifung konstant anstieg und letztendlich den vergleichsweise höchsten Wert ergab. Dies wurde auf den zuvor getesteten höheren Fettgehalt im Käsebruch zurückgeführt. Auch seine Festigkeit wurde durchaus positiv bewertet. Er war im Vergleich zu den anderen Produkten signifikant weicher. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der stärkeren Hydrolyse der Caseine. Auch bei der Bitterkeit schnitt der mit dem pflanzlichen Präparat erzeugte Käse am besten ab. Insgesamt wurde der Gesamteindruck des mit Microlant erzeugten Käses und bezüglich Cremigkeit und Bitterkeit von beiden Gruppen am schlechtesten bewertet [CHEN et al., 2003].

Tabelle 4: Sensorische Bewertung von Pecorino Käse durch geschulte Sensoriker auf einer Skala von 0 bis 10 (0 = Minimum, 10 = Maximum) [CHEN et al., 2003]

Qualitätsmerkmal	Reifungstage	Koagulant		
		<i>C. cardunculus</i>	Naturen	Microlant
Festigkeit	30	2,9	4,2	3,9
	60	2,8	4,0	4,1
	90	2,5	3,4	4,1
Cremigkeit	30	5,1	3,7	3,4
	60	5,7	4,3	3,2
	90	6,2	3,8	3,4
Bitterkeit	30	2,8	3,2	3,5
	60	2,9	3,1	3,7
	90	2,6	2,6	2,9
Gesamteindruck	30	4,8	4,7	4,4
	60	5,8	5,1	4,7
	90	6,1	5,0	4,8

6.4.2.4 Vergleich der Proteolyse in mit Extrakten von *Cynara cardunculus* erzeugtem Schafmilchkäse anhand zweier Studien

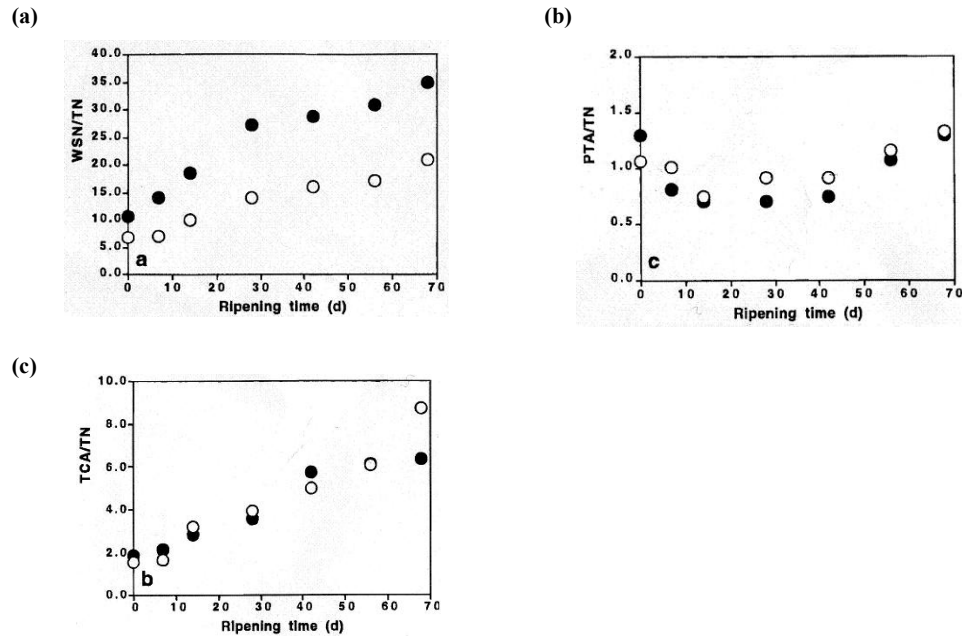
Sousa und Malcata (1997) publizierten eine Vergleichsstudie über diverse Effekte von Kälbermagenlab und pflanzlichem Lab auf die primäre Proteolyse in der Schafkäseherstellung.

Zum Dicklegen von einem Liter Rohmilch wurden 0,16 g der getrockneten Pflanzenstiele von *C. cardunculus* gerieben und 10 Minuten lang in Leitungswasser getränkt und geschüttelt. Die Koagulationsdauer betrug ca. 50 Minuten.

Für die Herstellung von Käse mit Naturlab wurde ein kommerzielles Produkt des Unternehmens Chris. Hansen's herangezogen, wobei die Milchgerinnung sich binnen etwa 30 Minuten vollzog.

Zur Charakterisierung der Proteolyse wurde der WSN-, der TCASN- und der PTASN-Gehalt gemessen und in Relation zum TN gestellt.

Abbildung 15: Veränderungen von WSN/TN (a), PTA-SN/TN (b) und TCA-SN/TN in Schafkäseproben, hergestellt mit Extrakten aus *C. cardunculus* (●) und Kälbermagenlab (○) [SOUSA und MALCATA, 1997]



Die Konzentration der WSN-Komponente wird hauptsächlich durch die Aktivität der Labenzyme hervorgerufen, sie hängt jedoch auch von den endogenen Bakterien und vom Plasmin der Milch ab. Das Verhältnis der WSN/TN stieg während der 68-tägigen Reifungszeit bei beiden Proben, war jedoch im Käse, der mit *C. cardunculus* erzeugt wurde, signifikant höher.

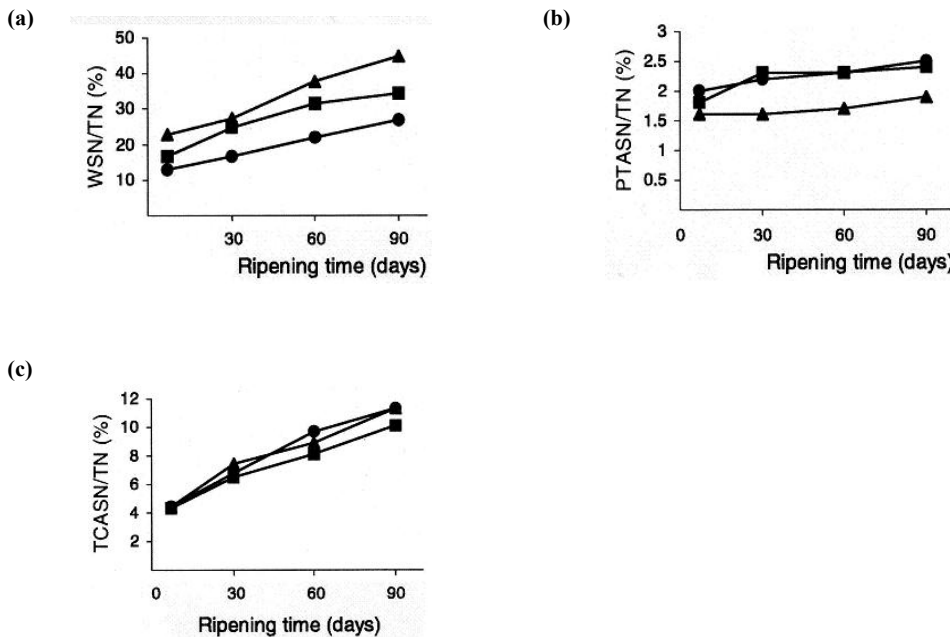
Der TCASN-Gehalt wurde gemessen, um die Aktivität der Milchsäurebakterien zu evaluieren. Er stieg während des gesamten Reifungsprozesses. Labenzyme leisten aber keinen signifikanten Beitrag zu seinem Anstieg.

Der FAA-Index (free amino acid index) wird über das Verhältnis des PTA-SN zum TN errechnet. Er sank während der ersten 14 bzw. 30 Tage der Reifung, stieg danach jedoch

kontinuierlich bis zum 68. Tag an. Hierbei zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den Proben. Dies wird durch die Bildung hochmolekularer Peptide erklärt, welche durch *C. cardunculus* nicht exzessiv zu kleinen Molekülen hydrolysiert wurden [SOUSA und MALCATA, 1997].

Chen et al. (2003) verglichen in einer Studie verschiedene chemische und sensorische Parameter von Pecorino Käse, einem semiharten Käse, der aus pasteurisierter Schafmilch unter Zugabe von mesophilen Starterkulturen hergestellt wurde. Für die Milchgerinnung wurde einerseits Kälberlab (Naturen), andererseits ein gereinigtes Präparat von *R. miehei* (Microlant) und weiters ein Extrakt aus den frischen Blüten von *C. cardunculus* herangezogen. Bei der Wahl der Dosis wurde auf äquivalente „milk clotting units“ (Dauer bis zur sichtbaren Koagulation und Bruchfestigkeit) geachtet.

Abbildung 16: Veränderungen von WSN/TN (a), PTA-SN/TN (b) und TCA-SN/TN in Schafkäseproben hergestellt mit Proteinasen aus *C. cardunculus* (▲), Kälbermagenlab (●) und Microlant (■) [CHEN et al., 2003]



Das Ausmaß und Muster der Proteolyse wurde durch Analysen der WSN, der TCASN und der PTASN bestimmt.

Der WSN-Gehalt war im Käse, der mit *C. cardunculus* produziert wurde, am höchsten und stieg während der 90-tägigen Reifung in allen Produkten linear auf das Doppelte.

Der PTA-SN-Gehalt wiederum hing vom eingesetzten Koagulanten ab und war im mit *C. cardunculus* hergestellten Käse am niedrigsten.

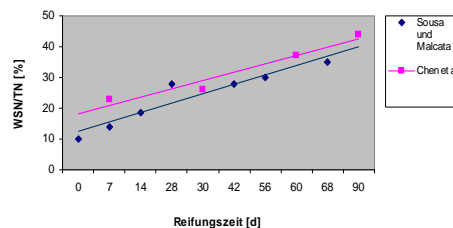
Der TCA-SN-Gehalt stieg bei allen Produkten ähnlich, da er hauptsächlich auf die proteolytische Aktivität der Säuerungskulturen und der milcheigenen mikrobiellen Flora zurückzuführen ist [CHEN et al., 2003].

Vergleich der mit *C. cardunculus* hergestellten Proben

WSN-Fraktion

Bei Betrachtung der WSN-Gehalte wird offensichtlich, dass sowohl in der Probe von Sousa und Malcata als auch in der von Chen et al. (2003) der Verlauf der Geraden ähnlich ist (s. Abb. 17). Beide Extrakte weisen also vergleichbare caseinolytische Aktivitäten auf.

Abbildung 17: Veränderungen des WSN-Gehalts

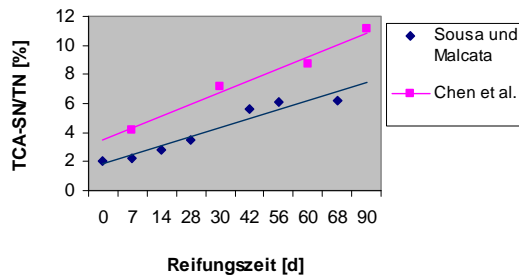


TCA-SN-Fraktion

Auch die TCA-SN-Gehalte steigen während des gesamten Reifungsprozesses linear an (s. Abb. 18). Die größere und mit der Reifungsdauer schneller steigende TCA-SN-

Fraktion in der Probe von Chen et al. (2003) ist wahrscheinlich auf die Gabe von mesophilen Starterkulturen nach der Pasteurisation zurückzuführen.

Abbildung 18: Veränderung des TCA-SN-Gehalts

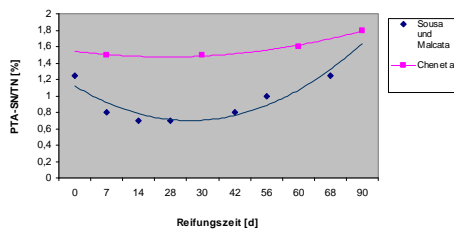


PTA-SN-Fraktion

Anders verhält es sich mit den PTA-SN-Gehalten, wie aus den folgenden Abbildungen ersichtlich ist. Das Verhältnis von PTA-SN zu TN gibt Auskunft über die Konzentration an freien Aminosäuren. Während in der Probe von Sousa und Malcata (2001) der PTA-SN nur langsam mit der Reifung ansteigt, sinkt er in der Probe von Chen et al. (2003) bis zum Reifungstag 14 ab, steigt jedoch ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende der Reifung ebenso rasch an (s. Abb. 19).

Die PTA-SN-Fraktion umfasst einerseits die durch den Koagulanten erzeugten Spaltprodukte, ihre Konzentration hängt jedoch auch von der Keimzahl im Substrat ab.

Abbildung 19: Veränderung des PTA-SN-Gehalts



Die sinkende Konzentration des PTA-SN im Käse von Sousa und Malcata (2001) erklärt sich dadurch, dass zur Käseherstellung Rohmilch herangezogen wurde.

Keimzahlmessungen an drei Stichtagen innerhalb des Reifungsprozesses ergaben, dass die Konzentration an Mikroorganismen mit dem Konsum der freien Aminosäuren der PTA-SN-Fraktion bis etwa zum 14. Tag zunächst anstieg, gegen Ende der Reifung hin jedoch wieder sank, während PTA-SN stieg.

Hingegen steigt die Konzentration der PTA-SN-Fraktion im Käse, der im Rahmen der Studie von Chen et al. (2003) hergestellt wurde, mit der Reifungsdauer langsam an. Hier wurde die Milch zwar pasteurisiert, vor dem Zusatz der Enzympräparate jedoch mit mesophilen Säurekulturen versetzt. Diese gewährleiten in der Regel eine konstante Qualität des Käses.

Dieser Vergleich verdeutlicht, dass beide pflanzlichen Extrakte unabhängig von der Herstellungsweise vergleichbare proteolytische Aktivitäten besitzen. Das Beispiel zeigt, dass die Fraktionierung der WSN-Verbindungen eine geeignete Methode ist, um den Fortschritt der Proteolyse zweier Käseproben der selben Sorte, die jedoch durch unterschiedliche Verfahren hergestellt wurden, zu vergleichen. Aus den Abbildungen geht jedoch auch hervor, dass ein einzelner Index nicht reicht, um die Käsereifung zu charakterisieren.

6.4.2.5 *Centaurea calcitrapa*

Tavaria et al. (1997) stellten zwei chromatographisch gereinigte Extrakte aus den Blüten von *Centaurea calcitrapa* her und verglichen deren unterschiedliche hydrolytische Aktivitäten auf sowohl Schafmilch- als auch Kuhmilchcaseine. *C. calcitrapa* gehört wie auch *C. cardunculus* zur Familie der Asteraceae und wird auf der Iberischen Halbinsel traditionell für die Schafmilchkäseherstellung eingesetzt.

Das Enzym aus Extrakt A setzte in dieser Studie alle Caseine langsamer und weniger intensiv als das Enzym aus Extrakt B um und wies eine mit dem kommerziellen Referenzpräparat, bestehend aus 75 % Chymosin und 25 % Pepsin, vergleichbar hohe Affinität zu den Kuhmilchcaseinen auf. Dennoch zeigte es eine höhere caseinolytische

Aktivität als das Naturlab. Diese Erkenntnisse bestätigen somit die bessere Eignung pflanzlicher Präparate zur Schaf- oder Ziegenmilchkäseherstellung, wo eine gesteigerte Proteolyse erforderlich ist [TAVARIA et al., 1997].

6.4.3 Neue Ansätze

In der Erzeugung von Kuhmilchkäse war die Anwendung pflanzlicher Extrakte aufgrund des intensiveren Proteinabbaus bislang größtenteils unbefriedigend. Während der letzten Jahre wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, um auch aus Kuhmilch mithilfe pflanzlicher Labaustauschstoffe qualitativ hochwertigen Käse herzustellen.

Beim Vergleich von mit Extrakten aus *C. Cardunculus* gleichartig hergestelltem Kuh- und Schafmilchkäse beispielsweise kommt man zur Feststellung, dass letzterer eine weniger feste Konsistenz aufweist. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung von Kuh- und Schafmilch, welche mehr Fett, Protein und Mineralstoffe, v.a. Calcium, enthält [LOW et al., 2006].

Andererseits untersuchten Banks und Muir mehr oder weniger erfolgreich den Einsatz von Extrakten aus *Cynara cardunculus* in der Herstellung von low-fat Cheddar Käse, um hier eine akzeptablere Konsistenz des Bruches zu erzielen. Dies gelang zwar hinsichtlich Festigkeit und Cremigkeit, jedoch kam es während des Reifungsprozesses zu Aromadefekten, ausgelöst durch die Bildung von Bitterpeptiden [O'MAHONY et al., 2003].

6.4.3.1 Ultrafiltration

Ein potenzieller Lösungsansatz ist die Aufkonzentrierung fester Bestandteile in der Milch durch Ultrafiltration. Die sich hierdurch ändernden Gegebenheiten führen jedoch dazu, dass die Milch frühzeitig koaguliert, da mit der gesenkten flüssigen Phase in der Milch der Abstand zwischen den Caseinmizellen abnimmt, was die Aggregation beschleunigt. Weiters ist die Proteolyse in UF-Milch eingeschränkt, κ -Casein wird nicht

vollständig hydrolysiert. Das Resultat ist ein Käse mit grober Körnung und schwachem Aroma.

Low et al. (2006) nahmen an, die bekanntlich exzessivere proteolytische Aktivität der pflanzlichen Milchkoagulantien könne diese Tatsache kompensieren. Daher verglichen sie die proteolytische Aktivität dreier verschiedener pflanzlicher Koagulantien (Extrakte aus *C. cardunculus*, *F. carica* und *C. papaya*) und Kälberlab (Naturen) auf reguläre Kuhmilch mit einem Proteingehalt von 3,47 +/- 2 % und auf ultrafiltrierte Kuhmilch unterschiedlicher Konzentrationen an Protein (bis etwa 14 %). Da eine Standardisierung aller eingesetzten Enzympräparate fehlschlug, wurden die Dosen so gewählt, dass reguläre Milch zumindest bei den Proben mit Naturen und *C. cardunculus* etwa zur selben Zeit sichtbar koagulierte.

In regulärer Milch setzte die Koagulation durch *F. carica* und *C. papaya* signifikant früher ein (21,5 und 12,7 Minuten) als durch Naturen (27,3 Minuten) und *C. cardunculus* (28,7 Minuten). Überraschenderweise waren die CT's für alle UF-Milchproben mit etwa 14 % Protein ähnlich (durchschnittlich 20 Minuten).

Mittels Kapillarelektrophorese wurde das Ausmaß der Hydrolyse der Caseine bestimmt. Während sich bei den Käsebruchproben, die mit Naturlab erzeugt wurden, keine Unterschiede bezüglich des Abbaus von κ -Casein zwischen regulärer und UF, koagulierter Milch zeigten (64 %), war das Ausmaß in der mit *C. cardunculus* behandelten, regulären Probe (70 %) im Gegensatz zur UF-Probe (61 %) geringer. In Milch, welche mit *F. carica* koagulierte, sank die Rate an hydrolysiertem κ -Casein mit steigender Gesamtproteinkonzentration. Schließlich deutete die Dicklegung mithilfe von *C. papaya* auf eine exzessive Hydrolyse sowohl in regulärer als auch in UF-Milch hin.

Die Analyse freier Aminosäuren ergab, dass die Proben, die mit Kälberlab und mit *C. cardunculus* hergestellt wurden, nur jeweils kleine Mengen aufwiesen, die restlichen Proben enthielten viel höhere Konzentrationen, welche mit der Zeit weiter anstiegen [LOW et al., 2006].

6.4.3.2 Präparatmischungen

O'Mahony et al. (2003) untersuchten in einer Studie die Auswirkungen des Einsatzes von Proteasen aus *C. cardunculus*, sowohl in reiner Form als auch gemischt mit Chymosin auf die Proteolyse bei der Erzeugung von Cheddar Käse.

Folgende Verhältnisse zwischen *C. cardunculus* (Cy) und Chymosin (Ch) wurden dabei verwendet: 1:0, 1:1, 1:3 und 0:1. Alle Präparate wurden auf äquivalente IMCU's eingestellt.

Die Probenanalysen zeigten, dass auch ein geringer Zusatz von Proteinasen aus *C. cardunculus* zum Chymosin-Präparat die Proteolyse wesentlich beeinflusste. So war nach einer einmonatigen Käsereifung die Gesamtkonzentration der Aminosäuren in der Probe mit der Mischung Cy/Ch 1:3 im Vergleich zur Probe, die mit 100 % Chymosin hergestellt wurde, etwa 6,6 mal so hoch, stieg bis zum Ende der Reifung (zwei Monate) jedoch nicht mehr so stark an.

Mischungen von Kälbermagenlab mit einem geringen Anteil an Proteinasen aus *C. cardunculus* haben somit anhand dieser Studienergebnisse das Potential, die Käsereifung zu beschleunigen [O'MAHONY et al., 2003].

7 ANALYSE DER MILCHGERINNUNGSSENZYME

7.1 Analysen einer Labprobe

Einige qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden der Milchgerinnungsenzyme wurden vom internationalen Milchwirtschaftsverband (International Dairy Federation) entwickelt. Derzeit finden neben dem IDF Standard 157:2007(E) die Standards 110B:1997 und 176:2002 Verwendung.

7.1.1 IDF Standard 157:2007(E)

Mithilfe dieses Standards lässt sich die Labstärke als proteolytische Aktivität des Rinderlabs bzw. jene von Chymosin, welches durch Fermentation synthetisiert wurde, bestimmen. Dabei wird die Zeitspanne ab dem Zusatz der Labprobe zum Milchsubstrat bis zum Einsetzen der sichtbaren Koagulation gemessen. Diese Methode wird als „REMCAT“ (relative milk-clotting activity test) bezeichnet.

Die Aktivität der Enzyme wird sowohl in Relation zum international standardisierten Kälberlabpulver (> 98 % Chymosin und < 2 % Pepsin), als auch zum international standardisierten Labpulver erwachsener Rinder (< 2 % Chymosin und > 98 % Pepsin), welche jeweils mit 1.000 IMCU (International Milk-Clotting Units)/g definiert sind, gestellt.

7.1.2 IDF Standard 110B:1997

Dieser Standard beschreibt den quantitativen Nachweis von Chymosin und Rinderpepsin in Kälberlab, Lab von erwachsenen Rindern bzw. Mischungen mit durch Fermentation hergestelltem Chymosin.

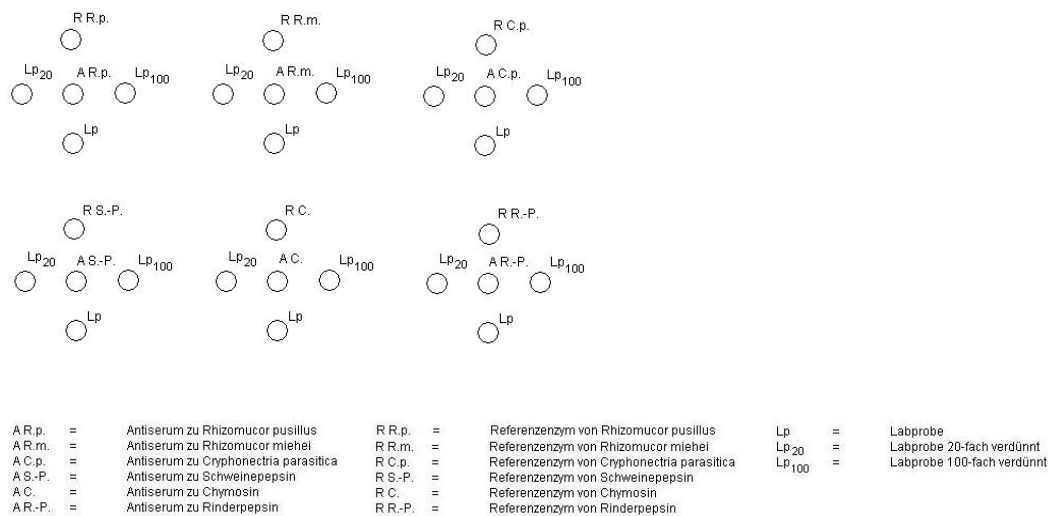
Hierfür wird die Labprobe unter Umständen zunächst mittels doppelter Immunodiffusion auf das Vorhandensein folgender häufig eingesetzter

Labersatzenzyme getestet: Schweinepepsin, Enzyme von *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* und *Cryphonectria parasitica*.

Das Prinzip des quantitativen Nachweises besteht in einer Trennung von Chymosin und Pepsin in der Labprobe mittels DEAE (Diethylaminoethylcellulose), einem Anionenaustauscher, wobei die Chymosinfraktion vor der Pepsinfraktion eluiert. Mittels IDF Standard 157 kann sodann die jeweilige Aktivität beider Fraktionen bestimmt werden. Diese wird in Prozent der Gesamtaktivität in IMCU oder in mg Enzym/l angegeben.

Für den Nachweis auf das Vorhandensein anderer Labersatzenzyme werden in auf Agarosegel eingestanzte Löcher, wie in Abbildung 20 dargestellt, Kaninchen-Antisera unterschiedlicher Spezifität, Referenzenzyme und Labproben in unterschiedlicher Konzentration pipettiert.

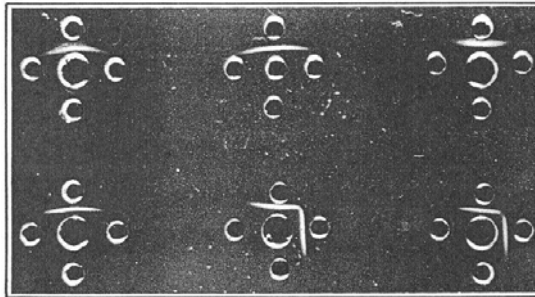
Abbildung 20: Analyse einer unbekannten Labprobe [IDF, 1996]



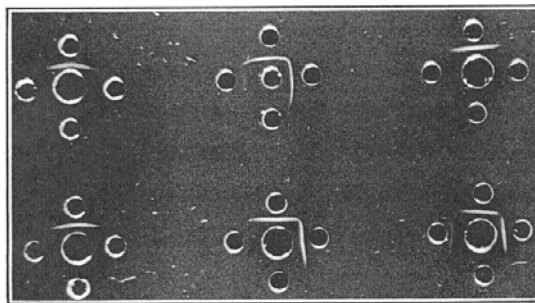
Durch Färbung der Agaroseplatten nach der Inkubation werden bei Vorhandensein von zumindest 1 % des jeweiligen Enzyms Fällungslinien, die sich aus der Wanderung der beiden Antagonisten zueinander ergeben, sichtbar und können interpretiert werden.

Abbildung 21: Ergebnisse der Analyse mittels doppelter Immunodiffusion für (a) Kälbermagenlab und (b) Kälbermagenlab mit 1 % des Enzyms von *Rhizomucor miehei* [IDF, 1996]

(a)



(b)



7.1.3 IDF Standard 176:2002(E)

Dieser Standard dient zur Bestimmung der Labstärke von mikrobiellen Labaustauschstoffen. Hierfür wurde ein international standardisiertes mikrobielles Labaustauschpulver in Relation zum international standardisierten Kälberlabpulver gesetzt. Die unterschiedlichen mikrobiellen Koagulanten sind mit etwa 1.000 IMCU/g definiert. Durch die Messung der Zeit ab dem Zusatz einer definierten Menge des Präparats zum Milchsubstrat bis zur sichtbaren Koagulation wird die Labstärke bestimmt und mit der des mikrobiellen Standardpräparats verglichen.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, muss auch hier zunächst mittels doppelter Immunodiffusion, wie in IDF 110 beschrieben, ausgeschlossen werden, dass das Präparat eine Mischung von Enzymen unterschiedlicher Herkunft enthält.

7.1.4 Nachweis von rekombinantem Chymosin in Kälberlab-Präparaten

Die Möglichkeit, natürliches Kälbermagenlab mit kostengünstigerem rekombinanten Chymosin anzureichern, erfordert Methoden zum Nachweis des Ursprungs des Proteins einer Probe.

Der Zusatz geringer Konzentrationen rekombinanten Chymosins zu kommerziellen Kälberlab-Präparaten kann mithilfe von ACP-ELISA oder sandwich-ELISA nachgewiesen werden, vorausgesetzt es kommen Rückstände von Proteinen, vom Mikroorganismus oder vom Nährmedium stammend, in der durch Fermentation hergestellten Chymosinlösung vor. Die Methode basiert somit auf einem Nachweis von Verunreinigungen [COLLIN et al., 1997].

Diese Methode ist jedoch nicht unbedingt zuverlässig. Durch einen Austausch des Wirtsorganismus etwa ändert sich auch die Zusammensetzung des Rückstands, die zuvor geltenden Zielproteine werden dann von den Antikörpern nicht mehr erkannt [LILLA et al., 2005].

Lilla et al. (2005) versuchten, die unterschiedliche Herkunft von rekombinantem und natürlichem Chymosin anhand von Analysen der Aminosäuresequenzen und mittels Massenspektrometrie nachzuweisen.

Das Chromatogramm zeigte für das Referenzchymosin einen Peak, der den beiden Varianten A (35.705,6 Da) und B (35.647,9 Da) entsprach. Variante A kam zu 35 %, Variante B zu 65 % vor. Danach wurden die Präparate Chymogen und Maxiren, welche ausschließlich Variante B enthalten, analysiert. Ihre Massen betrugen 35.648,5 bzw. 35.649,7 Da. Für Chy-Max, welches Variante A enthält, lag der Wert bei 35.706,2 Da. Mithilfe dieser Methode war somit keine Unterscheidung zwischen aktiviertem rekombinanten und natürlichem Chymosinen möglich.

Bei der Bildung von Chymosin erfolgt eine Autoproteolyse im aktivierten Prochymosin und zwar hauptsächlich der Bindung Phe_{42p}-Gly₁. Hier fand man jedoch Unterschiede bezüglich der Region der Proteolyse.

So wiesen Lilla et al. (2005) mittels ESI-MS nach, dass bei der Spaltung des Prochymosins zur aktiven Form nicht immer nur das N-terminale Peptid bestehend aus 19 Aminosäuren gebildet wird, sondern die Hydrolyse auch an anderen Orten stattfinden kann, vom N-terminalen Peptid somit eine kürzere als auch eine längere Version entstehen kann. Der Ort, an welchem eine Proteolyse stattfindet, scheint von der Herkunft des Chymosins abhängig zu sein.

So wurden nach der Autoproteolyse die Peptide 38p-19 und 39p-19 nur beim rekombinanten Chymosin gefunden, die Peptide 4-19, 5-19 und 6-19 nur beim bovinen Chymosin; die Peptide 40p-19, 1-19 und 3-19 kamen hingegen bei allen Präparaten vor [LILLA et al., 2005].

7.2 Nachweis von Lab und Labersatzenzymen in Käse

Bei der Käseerzeugung tritt ein Großteil der zugefügten Labenzyme in die Molke über. Die im Bruch verbleibenden Gerinnungsenzyme spielen jedoch eine entscheidende Rolle in der Reifung bestimmter Käsesorten. Daher ist eine Entwicklung sensibler Methoden zum Nachweis dieser geringen Konzentrationen aktiver Labenzyme zur Qualitätskontrolle nützlich.

Wieviel Chymosin im Bruch verbleibt, ist vom pH-Wert der Käsereimilch, der zugesetzten Menge an Lab und von einer etwaigen Hitzebehandlung der Milch bzw. des Bruches während des Käsungsprozesses abhängig. Kommen mikrobielle Labersätze zum Einsatz, spielt die Säuerung der Milch keine Rolle [KINDSTEDT et al., 1995].

Boudjellab et al. (1998) gelang es, mittels ELISA Schweinepepsin in Weichkäse nachzuweisen. Bei dieser Methode kommen Antikörper zum Einsatz, um Schweinepepsin von Chymosin und der Protease von *Cyphonectria parasitica*

unterscheiden zu können. Ab einer Konzentration von zumindest 10 ng Antigen pro ml ist diese Methode aussagekräftig [BOUDJELLAB et al., 1998].

Hurley et al. (1999) entwickelten eine einfache, schnelle und sensitive Methode zum Nachweis der Restaktivität von Labenzymen. Diese wurden aus Käseproben extrahiert und mit einem synthetischen Heptapeptidsubstrat (Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu) inkubiert. Folglich kam es zur Bildung eines einzelnen Peptides ([NO₂-Phe]-Arg-Leu), welches quantitativ mittels RP-HPLC gemessen wurde. Es zeigte sich eine Proportionalität der Konzentration des Peptides zur Menge an aktiven Labenzymen im Substrat [HURLEY et al., 1999].

8 SCHLUSSBETRACHTUNG

Eine für die heutigen Bedürfnisse der Industrie notwendige Produktion von Kälbermagenlab ist einerseits in dem Umfang nicht mehr möglich, andererseits wird sie zunehmend unrentabel, betrachtet man die Situation in Groß-Britannien, da die Herstellung von Chymosin aus genmodifizierten Mikroorganismen weniger kostenintensiv ist. Obwohl in Österreich sein Einsatz von geringer Akzeptanz ist, könnte dieser Trend in Zukunft auch hier Fuß fassen.

Der Einsatz von rekombinantem Lab in der Industrie ist mit einigen Vorteilen verbunden. So sind die Präparate reiner, was bedeutet, dass aus der selben Menge Milch mehr Käsemasse gewonnen werden kann als es mit natürlichem Lab der Fall ist. Daneben zeigen einige Studien, dass die Produktion von Käse mit GVO-Lab in geringerem Ausmaß von Qualitätsmängeln betroffen ist, da die Proteolyse reinen Chymosins stark eingeschränkt ist.

Da die Käseproduktion mithilfe von GVO-Lab in Österreich jedoch unüblich ist, beschränkt sich der Einsatz auf die anderen kommerziellen mikrobiellen Präparate. Die Qualität von Käse, der mithilfe von Pilz-Proteinasen erzeugt wurde, ist für gewöhnlich durchaus mit einem durch Kälbermagenlab erzeugten Referenzprodukt vergleichbar.

Doch obwohl mikrobielle Proteinasen schon seit den 1970ern im großen Maße Anwendung finden und deren Spezifitäten, mit welchen diese das Milchcasein abbauen, recht detailliert nachvollzogen werden können, mangelt es an Studien, im Rahmen derer experimentell Käse erzeugt und dessen Qualität verglichen wird. Bekannt ist, dass deren unspezifische Reaktionen gegenüber den spezifischen Aktivitäten überwiegen und somit Einbußen bei der Käseausbeute in Kauf genommen werden müssen.

Bei Betrachtung des Aromenprofils von Käse, welcher mit mikrobiellen Proteinasen hergestellt wurde, zeigt sich, dass diese sich am ehesten am Abbau der β -Casein beteiligen, allem voran die Proteinase von *Cryphonectria parasitica*. Wird dabei ein

bestimmtes Ausmaß überschritten, beeinträchtigt dies die sensorischen Eigenschaften von Käse negativ. Die gebildeten Bitterpeptide verursachen zumeist ein Fehl aroma.

Pflanzliche Labersatzenzyme sind kaum wissenschaftlich untersucht. Eine Ausnahme stellen die Enzyme von *Cynara cardunculus*, Cardosin A und B, dar. Der Einsatz dieser Enzyme hat jahrhundertlange Tradition in verschiedenen Regionen mediterranen Klimas. Hier dient der Extrakt der Produktion von Schafmilchkäse, vor allem in Hofkäsereien. Beim Vergleich sensorischer Analysen von Schafkäse, welcher im Rahmen einer Studie einerseits mit Kälbermagenlab, andererseits mit den Proteinasen aus *C. cardunculus* und mit einem mikrobiellen Präparat hergestellt wurde, stellte sich heraus, dass das Produkt, welches mit dem pflanzlichen Extrakt erzeugt wurde, durchaus mit dem durch Kälbermagenlab hergestellten Produkt konkurrieren konnte und der mithilfe des mikrobiellen Labs erzeugte Käse am schlechtesten abschnitt.

Beim Heranziehen zweier Publikationen, welche die Produktion von Schafmilchkäse mit Extrakten aus *C. cardunculus* beschreiben, kommt man zum Schluss, dass, obwohl beide Präparate unterschiedlich hergestellt wurden, die caseinolytische Aktivität ähnlich verläuft. Die Darstellung des Fortschrittes der Käsereifung mittels Fraktionierung der N-Verbindungen scheint sich also für den Vergleich der Proteolyse innerhalb einer Käsesorte zu eignen. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass nicht ein einzelner Index dazu herangezogen werden kann. Während die Konzentration der WSN hauptsächlich von der Aktivität des Koagulanten abhängt und in diesem Fall für beide Proben einen ähnlichen Verlauf zeigt, werden die Konzentrationen von TCA-SN und PTA-SN hauptsächlich durch die Aktivität von Mikroorganismen und anderen Enzymen beeinflusst. Die unterschiedlichen Bedingungen resultieren also auch in unterschiedlichen Kurven bzw. Geraden.

Außerdem wurden während der letzten Jahre einige Studien publiziert, die auch eine erfolgreiche Anwendung des Extraktes von *C. cardunculus* in der Erzeugung von Kuhmilchkäse zeigen. Dies lässt sich durch die Ähnlichkeit der Spezifitäten zwischen den beiden Cardosinen und den Enzymen des Kälbermagenlabs, Chymosin und Pepsin erklären.

Der Versuch von O'Mahony et al. (2003), durch Mischungen von Chymosin mit den Cardosinen eine weichere Textur in low-fat Käse zu erlangen, war ebenfalls erfolgreich. Dennoch finden diese keine Anwendung in großem Format.

Methoden zum unkomplizierten Nachweis von rekombinantem Chymosin scheinen in der heutigen Zeit von großem Belang. Lilla et al. (2005) fanden immerhin einen Ansatz, um Kälbermagenlab vom kostengünstigeren Chymosin aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen mittels MS zu unterscheiden. Das Prinzip besteht in einem Nachweis der Aminosäuresequenz des abgespalteten Signalpeptids bei der Bildung von aktivem Chymosin. Eine rasche Analyse von GVO-Chymosin in einem Misch-Präparat stellt daher immer noch eine große Herausforderung dar.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einsatz des Kälbermagenlabs und seiner Alternativen in der Käseerzeugung.

Während die Verwendung mikrobieller Labersatzenzyme und im Besonderen die von Chymosin aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen heutzutage weit verbreitet ist, konnten sich pflanzliche Enzyme industriell nicht etablieren. Diese finden weiterhin vor allem in schafmilchverarbeitenden Hofkäsereien Anwendung.

Aufgrund der geringen Akzeptanz des Zusatzes von GVO-Lab als Käseerhilfsstoff in Österreich und in anderen europäischen Ländern mit Käsetradition scheint eine genauere Betrachtung der kommerziellen mikrobiellen Labpräparate daher sinnvoll.

Zahlreiche Studien kommen zum Schluss, dass mithilfe von Präparaten pflanzlichen Ursprungs qualitativ hochwertige Produkte erzielt werden können. Dennoch ist der Einsatz solcher Proteinase hierzulande unüblich.

Ein Vergleich verschiedener Parameter in Käseproben, welche sowohl mit Kälbermagenlab bzw. Chymosin als auch mit Proteinase, welche aus unterschiedlichen Mikroorganismen und Pflanzen gewonnen werden, soll Vor- und Nachteile dieser Alternativen aufzeigen. Hierbei wird neben den möglichen Herstellungsmethoden auch die Spezifität, mit welcher die verschiedenen Enzyme ein Substrat umsetzen, beleuchtet, um letztendlich Aussagen über die Käsequalität und –quantität machen zu können.

Lebensmittelverfälschungen werden heutzutage immer häufiger aufgedeckt. Auch die Milchindustrie bleibt hiervon nicht verschont. Es besteht somit die Notwendigkeit von Verfahren zum Nachweis von Enzymen und deren Herkunft in den Präparaten. Zudem kann das Wissen über das Vorhandensein aktiver Enzyme im Produkt Käse von großer Bedeutung sein. Diese Arbeit beschäftigt sich daher ebenso mit den analytischen Methoden zur Qualitäts- und Quantitätsmessung von Lab und Labersatzenzymen.

10 SUMMARY

This work describes the application of rennet and its alternatives in cheese production.

While the application of microbial rennet alternatives, especially chymosin produced by genetically modified microorganisms is common practice, the application of enzymes originating from plants has never become an established technique within the industry. The application of such enzymes is mostly limited to small scale ovine cheese production.

Because of the uncommon usage of GMO-chymosin as an additive in cheese production in Austria and other European countries with a long history in cheese production, a further study of commercial microbial rennets is deemed useful.

Numerous studies conclude that the application of plant based rennets can help in achieving the production of high quality products. However, the application of such proteinases is uncommon in Austria.

A comparison of different parameters in cheese samples using rennet, GMO-chymosin, microbial proteinases and plant proteinases shows the advantages and disadvantages of using such rennet alternatives. Apart from differences in production techniques, the specificity with which the different enzymes transform the substrate is also examined to make claims about the quality and quantity of cheese in the production process.

Nowadays, food falsifications are increasingly often discovered, even in the milk industry. To discover such falsifications methods for the detection of certain enzymes in the preparations and their origin are required. Furthermore knowledge of the existence of active enzymes in cheese can be of great importance. For these reasons this work also deals with analytical methods for measuring the quality and quantity of rennet and rennet alternatives.

11 LITERATURVERZEICHNIS

ALBRECHT-SEIDEL M, MERTZ L. Die Hofkäserei. Ulmer KG, Stuttgart. 2006; 73-91

ALBRIGHT J L, TUCKEY S L, WOODS G T. Antibiotics in Milk—A Review. Journal of Dairy Science 1961; 44: 779-807

ARDÖ Y. Evaluating Proteolysis by Analysing the N Content of Cheese Fractions. Bulletin – The International Dairy Federation 1999; 337: 4-9

BELITZ H, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2008; 514-563

BOUDJELLAB N, GROSCLAUDE J, ZHAO X, COLLIN J C. Development of an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of residual porcine pepsin in a soft cheese sample. Journal of agricultural and food chemistry 1998; 46: 4030-4033

CHEN S, AGBOOLA S, ZHAO J. Use of Australian cardoon extract in the manufacture of ovine milk cheese – a comparison with commercial rennet preparations. International Journal of Food Science and Technology 2003; 38: 799-907

COENEN J. Gentechnisch hergestellte Hilfs- und Zusatzstoffe: Angebot, Nachfrage und Marktentwicklung im Molkereibereich. Deutsche Molkerei Zeitung 2000; 1: 5-7

COLLIN J C, MOULINS I, ROLET-REPECAUD O, BAILLY C, LAGARDE G. Detection of recombinant chymosin in calf rennet by enzyme-linked immunosorbent assay. Lait 1997; 77: 425-431

EL SODA M. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiology Reviews 1993; 12: 239-251

EC, Eurostat and Agriculture (2007). Slaughtering of adult bovine animals and calves. Internet: http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/2007/table_en/41511.pdf, Zugriff am 01.11.2008

FOX P. Cheese: An Overview. Cheese – chemistry, physics and microbiology (Chapman and Hall), Aspen Publishers, Inc., New York, 1993; 1-36

FOX P, GUINEE T, COGAN M, McSWEENEY P. Fundamentals of Cheese Science, Springer-Verlag GmbH, Berlin, 2000; 98-137

FOX P F, McSWEENEY P L H. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk (Law B A). Blackie Academic & Professional, London, 1997; 1-49

GMO Compass. Chymosin (2008). Internet: <http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/83.chymosin.html>, Zugriff am 02.02.2009

GOY D, HÄNI J, WECHSLER D, JAKOB E. Die Bedeutung des Kaseingehaltes von Käseemilch (2005). Internet: http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_GoyD_2005_16006.pdf, Zugriff am 03.03.2009

GRAVERT H O. Die Milch – Erzeugung, Gewinnung, Qualität. Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 1983; 216

HURLEY M J, O'DRISCOLL B M, KELLY A L und McSWEENEY P L H. Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. International Dairy Journal 1999; 9: 553-558

IOWA STATE UNIVERSITY (2008). Caseinmizelle. Internet: <http://www.public.iastate.edu/~cford/101caseinmicell.gif>, Zugriff am 17.12.2008)

JAKOB E. Bittergeschmack von Käse (2006). Internet: http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_JakobE_2006_16057.pdf?PHPSESSID=39f86679ad874421cb413aaa19bdaa49, Zugriff am 10.12.2008

JAKOB E. Genetischer Polymorphismus der Milchproteine. I. Die genetischen Varianten. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung 1994; 23: 3-8

JAKOB E, SCHMID A, WALTHER B, WECHSLER D, WEHRMÜLLER K. Käse, ein wertvolles Lebensmittel, 2008. Internet: http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_JakobE_2008_16962.pdf?PHPSESSID=1619d9fe5dbfd2e63181362c473a0b13 (Zugriff am 16.01.2009)

JAROS D, SEITLER K, ROHM H. Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. International Journal of Food Science and Technology 2008; 43: 1721-1727

JOHNSON M E. Fundamentals of Dairy Chemistry (Chapman and Hall), Aspen Publishers, New York, 1988; 634-654

KAMMERLEHNER J. Milchgerinnungsenzyme: Von der manuellen Labbereitung bis zur Großfabrikation von tierischem Lab und von Labaustauschstoffen – ihre Attribute. Deutsche Molkerei Zeitung 1999; 13: 554-564

KEHOE S I, HEINRICHS A J. Vom Monogastriden zum Wiederkäuer: Gastrointestinale Entwicklung bei Milchkälbern. Großtierpraxis 2004; 5: 33-36

KINDSTEDT P S, YUN J J, BARBANO D M, LAROSE K L. Mozzarella Cheese: Impact of Coagulant Concentration on Chemical Composition, Proteolysis and Functional Properties. Journal of Dairy Science 1995; 78: 2591-2597

LAWRENCE R C, CREAMER L K, GILLES J. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science* 1987; 70: 1748-1760

LILLA S, MOGNA G, ADDEO F. Validation of Recombinant and Bovine Chymosin by Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005; 53: 5230-5328

LÖSCHE K. Enzyme: Etablierte und zukünftige Einsatzmöglichkeiten für Enzyme in der Milchtechnologie. *Enzyme der Lebensmitteltechnologie* (Lösche K), Behr's Verlag, Hamburg, 2000; 41-62

LAWRENCE R C, CREAMER L K, GILLES J. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science* 1987; 70: 1748-1760

LOW Y H, AGBOOLA S, ZHAO J, LIM M Y. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltrated bovine skim milk. *International Dairy Journal* 2006; 16: 335-343

MARILLEY L, CASEY M G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 90: 139-159

McGOLDRICK M, FOX P F. Intervarietal comparison of proteolysis in commercial cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 1999; 208: 90-99

McSWEENEY P L H, FOX P F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 1997; 77: 41-76

MAURER J, SCHAEREN W, BADERTSCHER R, BÜTIKOFER U, COLLOMB M, SIEBER R. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von Schafmilch schweizerischer Herkunft. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2006; 97: 433-453

ÖKOLANDBAU (2008). Lab und Labaustauschstoffe. Internet:

<http://www.oekolandbau.de/verarbeiter/zutaten-und-zusatzstoffe/zusatzstoffe-und-technische-hilfsstoffe/lab-und-labaustauschstoffe/> (Zugriff am 20.03.2009)

O'MAHONY J A, SOUSA M J, McSWEENEY L H. Proteolysis in miniature Cheddar-type cheese made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology* 2003; 56: 52-58

PULINA G, BENCINI R. *Dairy Sheep Nutrition*. CABI Publishing, London, 2004; 1-12

RENNER E. *Micronutrients in Milk and Milk-Based Food Products*, Elsevier science publishers LTD, New York. 1989; 49-50

RYFFEL S, JAKOB E. *Schafmilchverarbeitung – Grundlagen, Besonderheiten und Rezepturen für die Praxis*. ALP forum 2008; 63: 1-20

SCHREIER K, SCHAFROTH K. Einsatz der Mikrofiltration zur Herstellung von Milchkonzentraten und deren Verarbeitung zu Halbhartkäse. *ALP science* 2007; 515: 1-30

STAVLUND K, KIERMEIER F. Beitrag zur Kontrolle von Labaustauschstoffen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung A* 1973; 152: 138-144

STERNBERG M. *Microbial Rennets*, *Advances In Applied Microbiology* (Academic Press, Inc.) Academic Press, New York. 1976; 135-158

SINGH H, CREAMER L. A Sensitive Quantitative Assay for Milk Coagulants in Cheese and Whey Products. *Journal of Dairy Science* 1990; 73: 1158-1165

SOUSA M J, ARDÖ Y, McSWEENEY P L H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 2001; 11: 327-345

SOUSA M J, MALCATA F X. Comparison of Plant and Animal Rennets in Terms of Microbiological, Chemical, and Proteolysis Characteristics of Ovine Cheese. *Journal of agricultural and food chemistry* 1997; 45: 74-81

TAM J J, WHITAKER J R. Rates and Extents of Hydrolysis of Several Caseins by Pepsin, Rennin, *Endothia parasitica* Protease and *Mucor pusillus* Protease. *Journal of Dairy Science* 1972; 55: 1523-1531

TAVARIA F K, SOUSA M J, DOMINGOS A, MALCATA F X, BRODELIUS P, CLEMENTE A, PAIS S. Degradation of Caseins from Milk of Different Species by Extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of agricultural and food chemistry* 1997; 45: 3760-3765

TEUBER M. Chymosin, *Handbuch Gentechnologie und Lebensmittel, Grundwerk* (Gassen H. G., Hammes W. P.), B. Behr's Verlag GmbH, Hamburg, 1997; 1-11

TOUSSAINT-SAMAT M. *A history of food*, Wiley-Blackwell, Paris. 1994; 115

WEHRMÜLLER K. Schafmilchprodukte in der Ernährung (2006). Internet: http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_WehrmüllerK_2006_16272.pdf, Zugriff am 28.03.2009

WEHRMÜLLER K, JAKOB E, MAURER J, RYFFEL S, SCHAEREN W. Zusammensetzung von Kuh-, Ziegen- und Schafmilch im Vergleich (2007). Internet: http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_WehrmüllerK_2007_16738.pdf, Zugriff am 28.03.2009

ZICKRICK K. Mikrobiologie der Käse. *Mikrobiologie der Lebensmittel – Milch und Milchprodukte* (Weber H). Behr's Verlag, Hamburg. 1996; 257-351

12 ANHANG

Lebenslauf

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Claudia Handler
Geboren: 9. März 1983 in Mödling, NÖ
Wohnhaft in: 2560 Berndorf, NÖ
e-mail: c.handler@skepticus.nl

Schulbildung

09/97 – 06/02 Höhere Lehranstalt für wirtschaftliche Berufe, Baden
09/93 – 06/97 Bundesgymnasium Berndorf, NÖ

Studium

seit WS 2002 Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

Berufspraxis

08/2008 Praktikum bei Staud's GmbH
 Qualitätskontrolle

07/2008 Praktikum am Bio-Bauernhof einschließlich Käserei

08 – 09/2007 Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften
 Labor und Recherche

07 – 10/2002 Firma Mosgöller & Partner Engineering GmbH
 Sekretariat und Buchhaltung

Weitere Qualifikationen

Sprachen: Englisch, fließend in Wort und Schrift
 Niederländisch, Grundkenntnisse
 Schwedisch, Grundkenntnisse

EDV: MS Office